

ÉTUDE DE FACTEURS CONTRIBUANT À LA TOLÉRANCE DE CULTIVARS DE  
LAITUE À LA TACHE BACTÉRIENNE CAUSÉE PAR *XANTHOMONAS CAMPESTRIS*  
PV. *VITIANUS*

par

Olbert Nicolas

Thèse présentée au Département de biologie en vue de  
l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, mai 2019

Le 16 mai 2019

*le jury a accepté la thèse de Monsieur Olbert Nicolas dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeure Carole Beaulieu

Directrice de recherche

Département de biologie

Madame Vicky Toussaint

Codirectrice

Agriculture et Agroalimentaire Canada

Professeure Chantal Beauchamp

Évaluatrice externe

Université de Laval

Madame Marie Thérèse Charles

Évaluatrice interne

Agriculture et Agroalimentaire Canada

Professeur Kamal Bouarab

Président-rapporteur

Département de Biologie

## SOMMAIRE

La tache bactérienne causée par *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* demeure une contrainte majeure à la production de la laitue au Canada. Pour combattre, cette maladie, l'utilisation de cultivars résistants constitue à date, la stratégie de lutte la plus prometteuse. Quoique des études antérieures aient déjà identifié des facteurs génétiques, comme le gène *Xar 1* (*Xanthomonas resistance 1*) impliqués dans la résistance de certains cultivars de laitue, d'autres facteurs morphoanatomiques, physiologiques et biochimiques, susceptibles d'influencer la résistance, ont été peu étudiés. Cette présente étude avait pour objectif d'identifier des facteurs contribuant à la résistance de la laitue à la tache bactérienne. Cette étude a permis d'établir trois niveaux de sensibilité avec notamment les cultivars tolérants : Batavia reine des glaces, Estival, Hochelaga et Little Gem; les cultivars intermédiaires : Gorilla et Romora et les cultivars sensibles: Chief, Gorilla, Paris Island Cos et Vista Verde. Des études sur la caractérisation des stomates ont permis ainsi de mettre en évidence la corrélation entre la résistance et la densité de stomates des cultivars. Les cultivars les plus sensibles présentent des densités de stomates plus élevées comparativement à celles des cultivars tolérants. La caractérisation ionomique des cultivars a révélé que la composition minérale d'un cultivar donné peut influencer son comportement par rapport à la tache bactérienne. Trois balances nutritionnelles ont significativement affecté la résistance de la laitue à la tache bactérienne. Cette étude montre également que la laitue modifie son profil ionomique notamment les balances [N,S | P] et [Na,Mg,K,Ca | N,S,P] lorsqu'elle est inoculée avec *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. Ce comportement, assimilable à l'immunité nutritionnelle, constitue une stratégie de défense utilisée par la plante pour renforcer son statut ionomique en vue de faire face à l'attaque de l'agent pathogène. Ce travail ouvre non seulement la voie à de nouvelles pistes de recherche impliquant d'autres pathosystèmes, mais aussi pourra servir de référence pour la lutte contre la TBL et à l'élaboration de meilleurs plans de fertilisation visant à renforcer les mécanismes de défense de la plante.

**Mots clés :** *Lactuca sativa*, tache bactérienne, dynamique de populations, ionome, *Xanthomonas campestris*

## REMERCIEMENTS

Cette thèse est le résultat de sacrifices personnels, de collaboration, de conseils et de motivation de gens qui m'ont soutenu tout au long de mes études. J'aimerais de ce fait remercier Dieu qui m'a toujours donné l'intelligence et la force nécessaires pour accomplir mes activités.

J'aimerais également remercier d'une façon spéciale, ma Directrice de thèse Carole Beaulieu qui, en plus de ses pertinents conseils scientifiques, a toujours trouvé la meilleure façon de m'encourager et aussi pour tout son support tout au long de mon projet de doctorat.

Mes remerciements vont aussi envers ma Codirectrice, Vicky Toussaint, la première à m'accepter comme étudiant au doctorat et qui m'a toujours soutenu en trouvant à chaque obstacle une formule pour m'aider à avancer avec compréhension, tolérance et volonté. Ce travail ne se serait pas concrétisé sans le soutien de ma conseillère Marie Thérèse Charles dont les précieux conseils et motivation m'ont servi de carburant pour arriver à destination. Elle n'a pas été seulement une conseillère mais aussi une grande sœur ayant eu une solution à chaque contrainte quelle qu'elle soit.

Je remercie sincèrement mon conseiller Kamal Bouarab, dont les portes étaient toujours ouvertes pour moi, de m'avoir prodigué ses précieux conseils scientifiques. Aussi, à tous ceux qui ont scientifiquement contribué à la réalisation de ce travail, entre autres, Serge-Étienne Parent de l'Université Laval, Sylvain Lerat, Daniel Garneau, Jean François Lussier, Eric Tsala, Gabrielle Archambault, Amadou Sidibe de l'Université de Sherbrooke; Gaston Mercier, Marie Ciotola, Mélanie Cadieux, Daniel Rolland, Dominique Roussel, Jérôme Boutin, Philippe Plamondon du Centre de recherche et de développement de Saint-Jean-sur-Richelieu. Toute ma reconnaissance envers le MAPAQ qui a financé mon projet de recherche ainsi qu'au Centre SÈVE et Agriculture et Agroalimentaire Canada.

Finalement, ce travail est dédié à ma famille particulièrement mon épouse, Magarie Nicolas Anselme, mes deux fils Olger et Jean Robert Nicolas qui m'ont inlassablement supporté au cours de mes études, à mes parents Louis Nicolas et Magalie Marcelin, à tous les haïtiens et tous les canadiens.

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iv
REMERCIEMENTS.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES FIGURES.....	xiv
 CHAPITRE 1.....	 1
INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	1
1.1- La laitue, <i>Lactuca sativa</i> L. ....	1
1.1.1- Origine et distribution.....	1
1.1.2- Importance économique.....	1
1.1.3- Description et diversité génétique .....	2
1.1.4- Maladies et ennemis .....	6
1.2- La tache bactérienne de la laitue.....	7
1.2.1- Généralités .....	7
1.2.2- Étiologie et écologie .....	9
1.2.3- Épidémiologie .....	10
1.2.4- Dynamique de populations de <i>Xcv</i> .....	11
1.3 - Interactions plantes-bactéries pathogènes .....	12
1.3.1- La défense basale ou immunité innée des plantes.....	14
1.3.1.1- La détection du pathogène.....	14
1.3.1.2- Les composantes de la défense basale .....	16
1.3.2- Considérations sur les interactions <i>Xanthomonas</i> -plantes.....	17
1.3.2.1- Caractéristiques génomiques des <i>Xanthomonas</i> spp. ....	18
1.3.2.2- Facteurs de virulence associés aux <i>Xanthomonas</i> spp. ....	19

1.3.2.2.1- Le système de sécrétion de type III ( <i>TTSS</i> ).....	19
1.3.2.2.2- Les systèmes de sécrétion de type II .....	20
1.3.2.2.3- Les adhésines.....	21
1.3.2.2.4- Les lipopolysaccharides et la xanthane.....	21
1.4- La résistance chez les plantes.....	22
1.4.1- La résistance passive .....	22
1.4.1.1- Contribution des stomates à la résistance passive .....	23
1.4.1.2- Contribution des éléments minéraux à la résistance .....	24
1.4.2- La résistance active.....	28
1.4.2.1. Les composantes de la résistance induite .....	29
1.4.2.1.1. La formation des barrières structurales .....	29
1.4.2.1.2- Les protéines de stress ou protéines PR.....	30
1.4.2.1.3- Les phytoalexines .....	31
1.4.2.2- Les gènes de résistance R chez les plantes.....	31
1.4.2.2.1- Cas de la laitue .....	32
1.4.2.3- Les gènes d'avirulence Avr chez les bactéries phytopathogènes .....	34
1.4.2.3- Rôle des stomates dans la résistance active.....	35
1.5- Moyens de lutte contre la TBL.....	37
1.6- Justification de cette étude .....	37
1.7- Hypothèse du projet .....	38
1.8- Objectifs .....	38
CHAPITRE 2.....	39
Relations entre les populations de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vitians</i> , les densités de stomates et la résistance de la laitue à la tache bactérienne.....	39
2.1- Introduction de l'article et contributions des auteurs.....	39
2.2 Abstract.....	42
2.3- Introduction .....	43
2.4- Materials and methods .....	44
2.4.1- Bacterial strains and inoculum preparation .....	44

2.4.2- Plant production .....	44
2.4.3- Lettuce inoculation .....	46
2.4.4- Assessment of susceptibility of lettuce to BLS.....	46
2.4.5- Evaluation of population dynamics .....	46
2.4.6- Characterisation of lettuce stomata .....	47
2.4.7- Statistical analyses.....	47
2.5- Results .....	48
2.5.1- Evaluation of lettuce susceptibility to BLS .....	48
2.5.2- Characteristics of stomata of lettuce cultivars .....	49
2.5.3- Population dynamics of <i>Xcv</i> on lettuce cultivars .....	52
2.6- Discussion .....	52
2.7- Acknowledgements.....	57
2.8- Funding .....	57
2.9- Supplemental material.....	57
2.10- References .....	57
 CHAPITRE 3.....	 60
L'ionome de la laitue infectée par <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vitians</i> .....	60
3.1- Introduction de l'article et contributions des auteurs.....	60
3.2- Abstract .....	63
3.3- Introduction .....	63
3.4- Materials and methods .....	66
3.4.1- Plant production .....	66
3.4.2- Lettuce inoculation .....	67
3.4.3- Ionome characterization.....	68
3.4.4- Statistical analysis .....	68
3.5- Results .....	69
3.5.1- Data preprocessing .....	69
3.5.2- Effects of cultivars and treatments on the ilr values .....	73
3.5.3- Effects of the ionome and BLS infection on resistance.....	77

3.6- Discussion .....	79
3.7- Author contributions and statement .....	85
3.8- Funding .....	85
3.8- Acknowledgement .....	85
3.9- Supplemental material.....	85
3.10- References .....	85
3.11- Conflict of interest statement .....	90
 CHAPITRE 4.....	 93
DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE .....	93
4.1- Le comportement des cultivars de laitue à la TBL .....	93
4.2- Contribution des stomates à la résistance de la laitue à la TBL .....	94
4.3- Contribution des éléments minéraux à la résistance de la laitue à la TBL .....	94
4.4- Conclusion.....	97
 BIBLIOGRAPHIE.....	 109



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAC	Agriculture et Agroalimentaire Canada
ADSI	Average disease severity index
ASM	Acibenzolar-S-méthyl
BRG	Batavia Reine des glaces
BCB	Blue Copper-Binding protein
CHI	Chief
EFR	EF-Tu Receptor
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FLS2	Flagellin-Sentitive 2
<i>RGAs</i>	gènes analogues de résistance
<i>RGCs</i>	gènes candidats de résistance
HRGPs	glycoprotéines riches en hydroxyprolines
GOR	Gorilla
HAMPs	Host-Associated Molecular Patterns
hrp	hypersensitive response and pathogenicity
ilr	Isometric log ratios
LMV	Lettuce Mosaic Virus
LZ	Leucine Zipper
LPS	lipopolysaccharides

LRR	Leucine Rich Repeat
MAMPs	Microbe-Associated Molecular Patterns
MAPKs	Mitogen-Activated Protein Kinases
MIMPs	Microbe-Induced Molecular Patterns
MAPAQ	Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec
NB-LRR	Nucleotide-binding site leucine-rich repeat
NBS	Nucleotide Binding Site
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PIC	Parris Island Cos
PR	Pathogenesis-Related
PRR	Pattern Recognition Receptor
RDA	Redundancy analysis
RLA	Résistance locale acquise
RSA	Résistance systémique acquise
RLK	Receptor-Like Kinases
ROI	Reactive Oxygen Intermediates
ROM	Romora
ROS	Reactive Oxygen Species)
ICP-OES	Spectroscopie d'émission optique par plasma à couplage inductif
SOD	Superoxide dismutase
T2SS	Système de sécrétion de type II
T3SS	Système de sécrétion de type III
T4SS	Système de sécrétion de type IV
TBL	Tache bactérienne de la laitue
TBDTs	Ton B-dependent transporters

TIR	Toll Interleukin Receptor
TUR	Turbo
TuMV	Turnip Mosaic Virus
UV-C	Ultraviolet-C
VIV	Vista Verde
<i>Xcv</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vitians</i>
<i>Xar1</i>	<i>Xanthomonas resitance 1</i>
YDC	Yeast extract-dextrose carbonate

## LISTE DES TABLEAUX

### Chapitre 1

Tableau 1.1	Maladies et ravageurs de laitue au Canada.....	6
Tableau 1.2	Quelques exemples de gènes de résistance et de gènes d'avirulence clonés.....	35

### Chapitre 2

Tableau 2.1	Average Disease Severity Index (ADSI) values for 10 lettuce cultivars inoculated with <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vitians</i> .....	45
-------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### Chapitre 3

Tableau 3.1	Susceptibility of ten lettuce cultivars used in this study when inoculated with <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vitians</i> .....	67
Tableau S1	Ionome composition of lettuce cultivars used in this study, infected with <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vitians</i> and uninfected.....	91
Tableau S2	Mineral concentration in infected and uninfected lettuce cultivars according to their group of resistance to BLS.....	92

## LISTE DES FIGURES

Chapitre 1		
Figure 1.1	Variation morphologique de la laitue.....	5
Figure 1.2	Symptômes de la tache bactérienne de laitue.....	10
Chapitre 2		
Figure 2.1	Photographs of 10 lettuce cultivars infected with <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vitians</i> and their corresponding controls sprayed with saline.....	50
Figure 2.2	Stomatal density and stomatal area on the adaxial and the abaxial leaf sides of 10 lettyuces cultivars with different levels of resistance to bacterial leaf spot.....	51
Figure 2.3	Stomatal micrograph of 10 lettuce cultivars.....	53
Figure 2.4	Variation of initial inoculums populations of <i>X. campestris</i> pv. <i>vitians</i> strain B07-007 and <i>Bacillus</i> sp. on 10 lettuce cultivars.....	55
Chapitre 3		
Figure 3.1	Bifurcating tree showing 11 hierarchically balances representing a subcomposition of nutrients in lettuce ionome.....	70
Figure 3.2	Density curves of balance variables by experiment and treatment before and after detrending the experimental effect.....	72
Figure 3.3	Effect of cultivars and treatments on the ilr values.....	75
Figure 3.4	Correlation (scaling 2) biplots of linear discriminant analysis of susceptibility groups for (A) uninfected and (B) infected across BLS infection susceptibility groups of cultivars.....	76

Figure 3.5	Redundancy analysis correlation triplot (scaling 2) with ionic balances as response and cultivar, treatment and their interactions as descriptors.....	77
Figure 3.6	Linear effects of nutrient balances and infection on the severity index with experiment as random intercept.....	78
Figure-Annexe 1a	Effet d'une solution minérale à base de cuivre et de zinc sur la TBL.....	98
Figure-Annexe 1b	Diminution des symptômes de la TBL due au traitement préalable à la solution minérale de cuivre et de zinc.....	99
Figure-Annexe 2.1	Effect of preharvest ultraviolet-C (UV-C) treatment on bacterial leaf spot symptoms assessed 14 d after inoculation.....	102
Figure-Annexe 2.2	Effect of preharvest ultraviolet-C (UV-C) treatment on bacterial leaf spot disease severity index. Disease severity was evaluated 14 d after inoculation.....	103
Figure-Annexe 2.3	Effect of preharvest ultraviolet-C (UV-C) treatment and <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vitians</i> infection on lettuce leaves.....	105
Figure-Annexe 2.4	Scanning electron micrographs of lettuce leaves 48 h after the application of a cumulative ultraviolet-C dose of 1.6 kJ m <sup>-2</sup> .....	106
Figure-Annexe 2.5	Scanning electron micrographs of lettuce leaves showing the effect of a 1.6 kJ m <sup>-2</sup> cumulative dose of ultraviolet-C radiation....	106

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION GÉNÉRALE

#### 1.1- La laitue, *Lactuca sativa* L.

##### 1.1.1- Origine et distribution

La laitue (*Lactuca sativa* L.) fait partie des cultures longtemps domestiquées soit 8 000 à 4 000 ans avant notre ère (Hancock 2004). La laitue serait originaire de l'Égypte où les premiers indices de son utilisation comme aliment ont été retrouvés dans des tombes. Toutefois, il semble que le centre de diversification des espèces de *Lactuca* est le sud-ouest de l'Asie dans la région du Tigre-Euphrate où la laitue est devenue une plante cultivée pour l'alimentation (Zohary et Hopf, 1993). La laitue a été introduite en Chine via la Perse entre 600 et 900 avant J.C (Lebeda et al., 2007). Diverses formes d'utilisation de la laitue primitive ont été rapportées comme l'utilisation de ses feuilles comme cigarette sans nicotine, l'extraction d'huile à partir de ses graines ainsi que du latex (lactucarium) de la tige et des tissus de *Lactuca virosa* L., utilisé en médecine pour ses propriétés sédatives et inductrices du sommeil (Ryder, 1986). La laitue romaine a été introduite en Italie puis en France au début du XV<sup>e</sup> siècle et la laitue dite pommée au XVI<sup>e</sup> siècle. La laitue a été introduite en Amérique probablement lors du deuxième voyage de Christophe Colomb en 1494 (Ryder, 1986).

##### 1.1.2- Importance économique

La laitue est un légume frais cultivé à travers le monde particulièrement dans les régions tempérées et subtropicales. La FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture) a recensé plus de 80 pays ayant une production significative de laitue. De très nombreuses variétés, adaptées à des milieux pédoclimatiques et à des habitudes culinaires très diverses, ont été développées au cours des XIX<sup>e</sup> et XX<sup>e</sup> siècles. La production mondiale de la

laitue dépassait les 22 millions de tonnes récoltées sur environ 1 million d'hectares en 2005. Les principaux pays producteurs sont la Chine (10 millions de tonnes), les États-Unis (5 millions de tonnes), l'Espagne (1 million de tonnes) et l'Italie (0,83 million de tonnes) (Mou, 2008).

La production canadienne de laitue pour l'année 2017 a été estimée à 86549 tonnes pour une superficie récoltée de 3835 ha (FAOSTAT, 2017). Le Québec produit plus de 83% de la laitue cultivée au Canada, lui conférant le rôle de leader de cette industrie au pays et bien positionné sur le marché Nord-Américain, puisque les périodes de production sont décalées avec les deux principaux états producteurs de laitue, la Floride et la Californie.

### 1.1.3- Description et diversité génétique

La laitue est un membre de la famille des Asteracea (Compositae), la plus grande famille des dicotylédones. Le genre compte environ 100 espèces (Singh, 2006) qui ne sont pas toutes compatibles à la laitue cultivée. Quatre de ces espèces, *L. serriola* L., *L. saligna* L., *L. virosa* L. et *L. sativa* L. (figure 1.1), sont compatibles à différents degrés, c'est-à-dire peuvent être croisées entre elles selon les méthodes conventionnelles d'hybridation. Elles sont toutes diploïdes avec  $2n = 2x = 18$  chromosomes et la taille génomique de la laitue est estimée à 2.5 Gb (Reyes-Chin-Who et al., 2017). *L. serriola* (la laitue sauvage commune) est parfaitement compatible à *L. sativa*. Elles sont considérées comme étant deux sous espèces issues d'une espèce commune (de Vries 1997). *L. saligna* est l'une des espèces méditerranéennes rencontrée en Europe, au nord de l'Afrique et au Moyen-Orient (Zohary, 1991; Lebeda et al., 2004b). Elle est pour sa part moins proche de *L. sativa*. Les croisements entre *L. sativa* et *L. saligna* sont plus faciles lorsque *L. saligna* est considérée comme parent femelle. *L. virosa* est aussi une espèce méditerranéenne moins proche de *L. sativa*. Des croisements avec la laitue cultivée sont très difficiles et les plants issus de la F1 sont souvent stériles.

*L. serriola* constitue une source importante pour l'amélioration de la laitue cultivée (*L. sativa*) parcequ'elle renferme des gènes de résistance aux maladies cryptogamiques comme l'anthracnose (*Microdochium panattonianum*) et le mildiou (*Bremia lactucae*) et certains insectes (Mou, 2008). D'autres groupes taxonomiques sont relativement proches de *L. sativa* ou *L. serriola* comme : *L. aculeata*, *L. altaica*, *L. augustana*, *L. georgica*, *L. dregeana*, et *L.*



*azerbaijanica* (Singh, 2006). Ils sont similaires taxonomiquement et certains croisements sont possibles avec *L. sativa* ou *L. serriola* (Lebeda, 1998).

D'un point de vue morphologique, la laitue est la plus diversifiée des espèces du genre *Lactuca*. Elle compte sept principaux groupes de cultivars distincts incluant la laitue à huile qui se distinguent par des caractéristiques phénotypiques (de Vries, 1997). Ce sont des morphotypes qui se différencient selon la forme et la dimension des feuilles, la texture, la formation de tête ou de tige :

- 1- La laitue Iceberg (figure 1.1 d) ou Crisphead lettuce (var. *capitata* L. *nidus* jaggeri Helm) (Iceberg type, Eissalat, Batavia) : Le type Crisphead a une tête sphérique pouvant peser entre 700 et 1000g. Ce morphotype est principalement cultivé aux États-Unis où il a été introduit peu après la découverte du continent.  
Il est également cultivé dans les pays de l'Europe central et de l'Ouest. Quatre groupes de laitue de ce morphotype ont été développés aux États-Unis : Imperial, Great lakes, Empire et Vanguard (Ryder, 1986).
- 2- La laitue pommée (figure 1.1 b) ou Butterhead lettuce (var. *capitata* L. *nidus* tenerrima Helm) (Kopfsalat) : La laitue Butterhead produit une tête plus petite et moins compacte que le type Crisphead pesant entre 150 à 350 g. Il est très populaire en Angleterre, en France, en Hollande et d'autres pays de l'Europe central et de l'Ouest. Au cours des dernières décennies, plusieurs cultivars de ce morphotype ont été développés et sont cultivés aux États-Unis comme les types Boston et Bibb (Ryder, 1986).
- 3- La laitue romaine (figure 1.1 c) ou Cos lettuce (*L. sativa* var. *longifolia* Lam., var. *romana* hort. in Bailey; Römischer Salat): Les laitues de ce morphotype présentent plutôt une tête allongée relativement ouverte au-dessus pesant jusqu'à 750 g.
- 4- La laitue feuille (figure 1.1 e) ou Leaf ou Cutting lettuce (var. *acephala* Alef., syn. var. *secalina* Alef., syn.var. *crispa* L.) (Gathering lettuce, Loose-leaf, Picking lettuce, Schnittsalat, Laitue à couper): Des laitues de ce type ne forment pas de cœurs et constituent un morphotype très hétérogène. Elles ont été très populaires aux États-Unis, en Italie, en France, aux républiques Tchèque et Slovaque (de Vries, 1997). Ces laitues peuvent peser 500 g lorsque toutes les feuilles sont récoltées.

- 5- La laitue tige (figure 1.1 h) ou Stalk (*Asparagus*) lettuce (var. *angustana* Irish ex Bremer, syn. var. *asparagina* Bailey, syn. *L. angustana* hort. in Vilm.; Stem lettuce, Stengelsalat. Majoritairement cultivées en Chine, les laitues de ce morphotype présentent une tige érigée de 50 à 60 cm de long et de 4 à 10 cm de diamètre. À part les très jeunes feuilles, les feuilles de cette laitue ne sont pas consommables à cause de leur latex.
- 6- Le type « Latin » ou Latin lettuce, (figure 1.1 f) (De Vries and Van Raamsdonk, 1994). Les laitues de ce morphotype ressemblent aux laitues romaines mais les feuilles sont plus courtes.
- 7- Laitue à huile (figure 1.1 g) ou oil seed lettuce : Ce type de laitue est caractérisé par la forte teneur en huile de ses graines (35%). Il n'est pas consommé comme légume. Ces laitues sont encore produites en Egypte (Ryder, 1986).



**Figure 1.1: Variation morphologique de la laitue.** a-h *L. sativa* types cultivés a Batavia, b Butterhead, c Romaine, d Crisp/Iceberg, e Cutting/leaf, f Latin, g Oilseed, h Stem/stalk, i-k sauvages *Lactuca* species. i *L. saligna*. j *L. serriola*. k *L. virosa*. (Walley et al., 2017)

#### 1.1.4- Maladies et ennemis

La laitue est attaquée par plusieurs maladies et ravageurs à travers le monde. Au Canada, des maladies cryptogamiques, virales, bactériennes ainsi que des insectes et nématodes attaquent également la laitue. Le tableau 1.1 présente les différents agents pathogènes et un ravageur retrouvés sur la laitue au Canada (Davis et al., 1997).

**Tableau 1.1: Maladies et ravageurs de la laitue au Canada**

Noms français	Nom anglais	Agent causal
Taches brunes	Alternaria leaf spot	<i>Alternaria cichorii</i>
Pourriture grise	Grey mold rot	<i>Botrytis cinerea</i>
Mildiou	Downy mildew	<i>Bremia lactucae</i>
Anthracnose	Anthracnose (ring spot)	<i>Microdochium panattonianum</i>
Gangrène	Phoma rot	<i>Phoma exigua</i>
Rouille	Rust	<i>Puccinia dioicae</i>
Nanisme	Pythium stunt	<i>Pythium tracheiphilum</i>
Rhizoctone brun ou Rhizoctone	Bottom rot	<i>Rhizoctonia solani</i>
Taches septoriennes	Septoria leaf spot	<i>Septoria lactucae</i>
Pourriture visqueuse	Head rot	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp <i>carotovorum</i>
Brûlure marginale	Marginal leaf blight	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>
Gros pivot parasitaire	Infectious corty root	<i>Rhizomonas suberifaciens</i>
<b>Tache bactérienne</b>	<b>Bacterial leaf spot</b>	<b><i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vitians</i></b>
Jaunisse de l'aster	Aster yellows	<i>Phytoplasme de la jaunisse de l'aster</i>
Mosaïque de la laitue	Lettuce mosaic	Virus de la mosaïque de la laitue Impatiens necrotic spot virus
Nécrose des racines	Root necrosis	Virus de la nécrose du tabac Tobacco necrosis virus
Maladie des grosses nervures	Big vein	Virus des grosses nervures

Nématode cécidogène du nord	Northern root-knot nematode	<i>Meloidogyne hapla</i>
Puceron de la laitue	Lettuce aphid	<i>Nasonovia ribisnigri</i>

Sources : 1-Noms des maladies des plantes au Canada 4<sup>e</sup> éd., Société de protection des plantes du Québec (2003). 2- Subbarao et al. 2017, Compendium of Lettuce Diseases and Pests

## 1.2- La tache bactérienne de la laitue

### 1.2.1- Généralités

La tache bactérienne de la laitue (TBL) causée par *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* (*Xcv*) (Brown), est une maladie d'une grande importance économique à travers le monde (Lu et Raid, 2013). Cette bactériose a été rapportée dans de nombreux pays où l'on cultive la laitue incluant le Canada (Carisse et al., 2000), les États-Unis (Bull et al., 2015, Hayes et al., 2014); l'Australie, l'Afrique du Sud, la Nouvelle Zélande, le Japon, l'Italie, le Venezuela, le Brésil, l'Allemagne, la Corée du Sud, la Turquie (Sahin et Miller, 1997; Barak et al., 2001; Bull et al., 2015). Au Québec, elle a été observée pour la première fois en 1994 (Toussaint, 1999).

Depuis quelques décennies, des épidémies liées à la TBL ont été enregistrées en Amérique du nord notamment en Californie en 1991 (Barak et al., 2001), en Floride au cours de l'hiver 1992-93 (Lu et Raid, 2013) et au Québec en 1996 où des pertes de rendement de l'ordre de 100% ont été atteintes dans certaines exploitations agricoles de l'Ouest de Montréal (Toussaint, 1999). La TBL est favorisée par des conditions climatiques chaudes et humides, ce qui explique sa fréquence au Québec au cours des mois de juillet et août lorsque la température et les conditions pluviométriques sont optimales. Les agriculteurs utilisent également l'irrigation par aspersion, une autre situation qui crée des conditions favorables à la propagation de la TBL (Wellman-Desbians, 1998). Des études épidémiologiques ont rapporté que cette bactériose peut être transmise par les semences (Sahin, 1997; Barak et al., 2002). Toutefois, plusieurs essais en vue d'isoler la bactérie à partir de lots de semences commerciales ont échoués (Bull, 2015). D'autres travaux de recherche ont montré que les débris de culture peuvent constituer d'importants

réservoirs pour cette bactérie, ce qui faciliterait sa propagation au cours d'une même saison de culture (Barak et al., 2001).

Les moyens de lutte contre la TBL les plus souvent envisagés par les agriculteurs sont des mesures prophylactiques visant à limiter la propagation de l'agent pathogène dans les champs. Toutefois la gestion même de cette bactériose demeure assez difficile à cause du caractère sporadique de la maladie.

Au Québec, seulement le confiné extra a été homologué en 2017 pour la laitue feuille. Les autres bactéricides à base de cuivre montrent des effets phytotoxiques sur la laitue lorsqu'ils sont appliqués aux doses recommandées sur les autres cultures (Toussaint, 2008). Aussi, l'utilisation de cultivars résistants constitue la stratégie de gestion la plus viable de la TBL (Bull et al., 2015; Hayes et al., 2014; Lu et Raid, 2013; Bull et Koike, 2005).

Des programmes de recherche visant à développer des cultivars résistants à la TBL de la laitue sont connus en Amérique du Nord. Citons à titre d'exemple le projet de développement de stratégies de gestion de la TBL du Ministère de l'Agriculture des États-Unis (USDA). Ces recherches ont permis d'identifier des génotypes montrant différents niveaux de résistance à la TBL en se basant sur des paramètres comme la dynamique de population, l'incidence et la sévérité de la maladie sur différents cultivars (Bull et al., 2015; Lu et Raid, 2013; Bull et al., 2007). Une autre étude sur les sources de la résistance de la laitue à TBL menée sur trois cultivars montrant des interactions incompatibles avec *Xcv* a permis d'identifier un gène de résistance *Xar1* (*Xanthomonas resistance 1*) qui serait responsable de la réaction d'hypersensibilité observée chez ces cultivars (Hayes et al., 2014). Ce gène de résistance a été identifié chez le cultivar La Brillante.

Au Québec, des travaux sur la résistance de la laitue à la TBL sont très peu approfondis. Le premier programme d'amélioration de la laitue a été mené au Centre de recherche et développement de Saint Jean-sur-Richelieu.

Ce programme d'Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC) a permis d'effectuer un travail préliminaire sur le comportement en serre des cultivars de laitue à la TBL. Une base de données a été générée, elle décrit le comportement de plus de 24 cultivars de laitue développés à partir de parents montrant différents niveaux de tolérance vis-à-vis de cette maladie (Toussaint et Jenni, 2001 : données non publiées). L'évaluation de ces cultivars en serre a permis de les classer

en fonction de leur degré de résistance à la TBL. Trois niveaux de résistance basés sur la sévérité de la maladie ont été identifiés. Parmi ces cultivars, se trouve Little Gem, un cultivar résistant, connu pour sa réaction hypersensible avec *Xcv* (Hayes et al., 2014; Bull et al., 2014).

Deux types de résistance peuvent être impliqués dans les mécanismes de défense des plantes : la résistance verticale dite monogénique et la résistance horizontale dite polygénique (Agrios, 2005). Les travaux de Hayes et ses collègues ont certes permis d'expliquer la résistance observée chez le cultivar la Brillante mais peu d'informations sont à date disponibles quant aux autres facteurs de résistance impliqués, expliquant des niveaux différents de résistance, de tolérance et de sensibilité chez les cultivars du Québec.

### **1.2.2- Étiologie et écologie**

Dans la littérature, d'autres appellations peuvent être attribuées à *X. campestris* pv. *vitians*: *X. axonopodis* pv. *vitians* ou *X. hortorum* pv. *vitians* (Blancard, 2003). Il s'agit d'une bactérie Gram négatif, aérobie, en forme de bâtonnet, à catalase positive et oxydase négative (Sahin et Miller, 1997). Les plantes atteintes de la tâche bactérienne présentent au début des petites taches huileuses de 1 à 2 mm de diamètre à la périphérie des feuilles puis, des nécroses marginales de couleur brunâtre à noirâtre (Figure 1.2).

Les lésions peuvent devenir coalescentes et provoquent de larges taches nécrotiques sur le limbe. Des chloroses peuvent être également observées en bordure des taches selon les cultivars (Toussaint, 1999).

Ainsi, de tels symptômes affectent la valeur marchande des laitues en réduisant leur qualité et en augmentant les pertes post récoltes (Barak et al., 2001).



**Figure 1.2: Symptômes de la TBL: taches huileuses au début de l'infection (1); taches nécrotiques (2);** (photos de Toussaint V., 2012)

La TBL est favorisée par des conditions humides liées aux pluies et à l'irrigation par aspersion. La bactérie se développe à des températures allant de 0 °C à 35 °C et sa température létale serait de 52 °C. La température optimale pour la croissance in vitro de *Xcv* se situe entre 26 et 28 °C mais l'optimum de température pour l'infection est de 22.7 °C (Robinson, 2006).

Une grille d'évaluation prenant en compte la sévérité de la maladie a été développée (Bull et al., 2007). Elle est basée sur les indices suivants : 0 = pas de symptôme sur les feuilles; 1= une à 10 lésions de diamètre inférieur à 3 mm; 2= plus de 10 lésions de diamètre inférieur à 3 mm; 3 : lésions dont le diamètre est supérieur à 3 mm et 4 = les lésions deviennent coalescentes sur une portion de la feuille.

### **1.2.3- Épidémiologie**

L'utilisation de semences contaminées constitue la principale source de l'inoculum primaire et par conséquent la première cause de propagation de l'agent pathogène sur des régions géographiquement éloignées (Al-Saleh et al., 2011). *Xcv* peut survivre sur des débris des végétaux en phase épiphytique pendant une courte période (Sahin, 1997). La bactérie peut être également disséminée d'une plante à une autre par l'eau d'irrigation au cours de la production des plantules en pépinière (Wellman Desbiens, 1999) et les mauvaises herbes jouent un rôle



dans la survie de *Xcv* (Fayette et al., 2018). Sur la feuille, la bactérie a besoin d'eau libre pour pénétrer dans le limbe via les stomates, les hydathodes ou les blessures. Ensuite, la maladie peut se propager de tissus en tissus, de feuille à feuille et de plante à plante par le biais d'éclaboussures au cours d'une pluie, d'irrigation par aspersion ou de vents (Blancard, 2003).

#### **1.2.4- Dynamique de populations de *Xcv***

Les parties aériennes des plantes, particulièrement les tissus foliaires constituent une importante niche écologique pour les microorganismes (Underwood et al, 2007). Cette niche écologique favorise la survie et souvent la prolifération des microorganismes comme des champignons et des bactéries avec des modes de vie épiphytes, saprophytes et/ou pathogènes.

Les bactéries épiphytes sont celles qui sont capables de se multiplier à la surface des feuilles et qui peuvent être enlevées par simple lavage (Hirano et al., 2000). Tandis que, les bactéries endophytes sont celles qui peuvent se développer dans les espaces intercellulaires, les cavités sous-stomatiques ou dans les tissus vasculaires. De nombreux microorganismes à la fois pathogènes ou saprophytes peuvent alors se développer ou survivre en épiphytes sur les feuilles sans causer de symptômes. Les épiphytes strictes complètent leur cycle de vie à l'extérieur des feuilles sans coloniser généralement l'apoplasme.

La taille d'une population bactérienne épiphyte peut renseigner sur le degré avec lequel une souche donnée est écologiquement adaptée à des niches particulières et est utilisée pour décrire de nombreuses interactions plantes/ agents pathogènes (O'Brien et Lindow, 1989). Les bactéries phytopathogènes foliaires doivent pénétrer dans les tissus foliaires pour initier leur pathogenèse. Beattie et Lindow (1995) décrivent deux stratégies de croissance, de survie et d'épidémiologie des bactéries pathogènes des feuilles. Une stratégie dite de tolérance qui permet aux bactéries de survivre aux conditions de stress comme les radiations UV et la faible disponibilité en eau. Une autre stratégie dite d'évitement basée sur la capacité des bactéries à exploiter des sites qui sont protégés de ces conditions de stress incluant des sites endophytes.

La dynamique de population est un paramètre qui permet d'évaluer la croissance d'un microorganisme donné (pathogène ou non pathogène) sur une plante hôte ou non. *Xcv* est l'une

des bactéries phytopathogènes capable de survivre en épiphyte à la surface des feuilles avant de produire des symptômes (Toussaint et al., 1999; Barack et al., 2002). Aussi, il a été démontré que chez des cultivars de laitues sensibles à la TBL, *Xcv* atteint sa phase stationnaire de croissance avec des populations maximales de  $10^8$  CFU/cm<sup>2</sup> à  $10^{12}$  CFU/g de tissus foliaire (Toussaint, 1999; Robinson et al., 2006; Al-Saleh et al., 2011). L'étude des dynamiques de population de *Xcv* a été effectuée sur la laitue par Sahin et Miller (1997).

Cette étude a montré que les populations de l'agent pathogène étaient significativement plus élevées chez les cultivars sensibles et des corrélations ont été obtenues entre la sévérité de la maladie et les populations bactériennes.

Un travail similaire réalisé par Bull et al. (2015) a montré que les populations de *Xcv* étaient significativement plus faibles chez des cultivars montrant une réaction d'hypersensibilité (comme Little Gem) et que l'agent pathogène se comportait différemment selon les mécanismes de résistance des cultivars. Il semble que ces différences de populations entre Little Gem et les autres cultivars est due à la réaction d'hypersensibilité retrouvée seulement chez Little Gem (Bull et al., 2015)

### **1.3 - Interactions plantes-bactéries pathogènes**

Le processus infectieux des bactéries pathogènes commence par la rencontre de ces derniers avec leur plante hôte. Pour le cas des bactéries foliaires comme les *Xanthomonas*, pour que l'infection soit efficace, les bactéries doivent pouvoir coloniser la surface de la feuille puis, atteindre ensuite les sites de pénétration. Lorsqu'une bactérie potentiellement pathogène, ayant franchie les barrières protectrices externes, est placée au contact d'une plante, dans des conditions environnementales favorables, un dialogue moléculaire débute. L'issue de ce dialogue va définir le type de relation qui s'établira entre les protagonistes. (Lepoivre, 2003).

Non pourvues en enzymes capables de dégrader la cuticule, les bactéries sont incapables de traverser l'épiderme de façon active (Fett et al., 1992). Ainsi, les bactéries pénètrent à l'intérieur de la plante par des ouvertures naturelles telles que les stomates, les hydathodes, les lenticelles et aussi par les blessures (Rudolph, 1993). Toutefois, la pénétration des bactéries dans les tissus peut impliquer aussi bien des mécanismes passifs qu'actifs. En effet, l'entrée passive des bactéries à l'intérieur des tissus se fait par le phénomène d'entrée et de sortie de l'eau de respiration, de transpiration et de guttation (Rudolph, 1993). Cependant, certaines bactéries phytopathogènes possèdent des facteurs de virulence leur permettant de manipuler activement l'ouverture des stomates. Citons à titre d'exemple des toxines bactériennes comme la coronatine, la syringoline ainsi que d'autres effecteurs comme AvrB, HopF2, HopM1, Hopx1 et HopZ1 contribuant à l'ouverture des stomates et par conséquent facilite l'entrée active des bactéries dans la plante (Aung and al., 2018).

Une fois dans les tissus végétaux, l'interaction entre la plante et la bactérie peut prendre deux aspects:

- la relation compatible: Elle se produit entre une plante hôte sensible et une bactérie virulente. La bactérie pénètre dans les espaces intercellulaires (puis les vaisseaux conducteurs pour certaines espèces) sans que la plante ne déclenche de mécanismes de défense. Les bactéries mettent alors en place des mécanismes leur permettant de détourner certains métabolites produits par les cellules végétales et qui sont nécessaires à leur multiplication, et suppriment les mécanismes de défense de la plante. Cette invasion de la plante par la bactérie se traduit également par l'apparition des symptômes (Agrios, 2005).
- la relation incompatible dans laquelle la plante est capable de résister à l'infection bactérienne : il y a reconnaissance rapide de la présence de bactéries dans les tissus, déclenchement des mécanismes de défense qui se traduisent principalement par la réaction hypersensible (mort des cellules végétales à proximité du site d'infection). Lors de cette réaction, des molécules de défense sont libérées par les cellules végétales. L'absence de cellules vivantes à proximité (confinement des bactéries) ainsi que la

présence des molécules de défense limite la multiplication bactérienne et empêche l'expression des symptômes (Agrios, 2005).

Dans les deux cas, la bactérie met en place des mécanismes d'attaque et de suppression des réactions de défense de la plante tandis que celle-ci met en place des mécanismes de reconnaissance et de défense. L'interaction se fait au niveau moléculaire via les produits de gènes transcrits de manière constitutive ou spécialement induits lors de l'interaction. Quels que soit la bactérie (pathogène, non pathogène ou avirulente) ou le type d'interaction (compatible ou incompatible), une plante déclenche en réponse à une bactérie des mécanismes faisant partie de la « défense basale », qui correspond à l'immunité innée des plantes. Lors d'une interaction incompatible avec une bactérie avirulente, la plante développe en plus de la défense basale une défense « gène-spécifique », qui dépend de la génétique des deux partenaires (Feys & Parker, 2000).

### **1.3.1- La défense basale ou immunité innée des plantes**

#### **1.3.1.1- La détection du pathogène**

La défense basale repose sur la capacité de la plante à détecter la présence des bactéries pathogènes ou saprophytes. Plus précisément, la cellule végétale reconnaît des motifs appelés « PAMPs » (Pathogen-Associated Molecular Patterns), ou de façon plus générale « MAMPs » (Microbe-Associated Molecular Patterns) (Gómez-Gómez, 2004). Ces motifs sont également appelés « éliciteurs » dans la mesure où leur détection déclenche les réponses de défense.

Si la reconnaissance des PAMPs et l'induction des réponses de défense procèdent de façon très similaire chez les animaux et chez les végétaux, il existe toutefois des particularités propres à chacun (Nürnberger et al., 2004). Dans ce paragraphe, nous nous limiterons à la description des réponses des plantes.

Les PAMPs sont des structures relativement invariables, présentes généralement sur l'enveloppe des bactéries et des champignons, absentes des cellules de l'hôte, et qui constituent donc une véritable signature trahissant la présence de l'agent pathogène. Ainsi, les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycanes et la protéine du flagelle bactérien (flagelline) sont les principaux

PAMPs des bactéries Gram négatif, présents à la fois chez les bactéries phytopathogènes et chez les pathogènes des espèces animales.

Dans le cas de la flagelline, il a été montré qu'un petit peptide de 22 acides aminés, appelé flg22, suffit à l'induction des réponses de la plante. La chimio-perception de flg22 par les cellules d'*Arabidopsis thaliana* a été caractérisée initialement dans l'interaction avec *Pseudomonas syringae* (Felix et al., 1999), et plus récemment avec *X. campestris* pv. *campestris* (Sun et al., 2006). Tout comme la flagelline, le facteur d'élongation EF-Tu bactérien déclenche lui-aussi les réponses de défense de la plante (Kunze et al., 2004).

Les PAMPs bactériens englobent par ailleurs des protéines sécrétées, telles que les « harpines » (Baker et al., 1993) ou les protéines « Cold Shock » (Felix et Boller, 2003).

Enfin, des fragments de la paroi végétale libérés sous l'action d'enzymes hydrolytiques bactériennes peuvent aussi jouer un rôle éliciteur dans la mesure où leur détection déclenche également les réponses de défense basales de la plante (Vorwerk et al., 2004). Dans ce cas, les termes « HAMPs » (Host-Associated Molecular Patterns) (Galletti et al., 2009) ou « MIMPS » (Microbe-Induced Molecular Patterns) (Bent et Mackey, 2007) sont plutôt utilisés. Ainsi, les oligogalacturonides produits lors de la dégradation de la pectine végétale sont d'excellents éliciteurs des réponses de défense des plantes (Davis et al., 1986).

Les récepteurs capables de reconnaître les PAMPs sont présents à la surface des cellules végétales et appelés « PRR » (Pattern Recognition Receptor) (Parker, 2003).

Des travaux menés chez *A. thaliana* ont conduit à la caractérisation fonctionnelle de EFR (EF-Tu Receptor), le PRR spécifique du facteur EF-Tu (Zipfel et al., 2006), et de FLS2 (Flagellin-Sensitive 2), le récepteur du peptide flg22 de la flagelline bactérienne (Gómez-Gómez et al., 2001), (Melotto et al., 2017). Ces deux récepteurs possèdent un domaine LRR (Leucine Rich Repeat) extracellulaire et un domaine kinase cytoplasmique, et sont désignés sous le terme générique « RLK » (Receptor-Like Kinases). La détection des pathogènes par ces récepteurs donne lieu à des réponses de défense très rapides (Nürnberger & Scheel, 2001).

### 1.3.1.2- Les composantes de la défense basale

Les composantes de la réponse de défense basale sont déclenchées de façon très précoce (moins de 10 minutes après le contact entre les 2 partenaires) chez une plante hôte ou non-hôte, quelle que soit la bactérie détectée (Abramovitch et al., 2006). Elles peuvent à elles seules suffire à établir la résistance de la plante, ou bien être insuffisantes, auquel cas la maladie se développera. Des réponses globales ont été observées chez certaines plantes, telles que la réduction du flux vasculaire au niveau des feuilles chez le tabac (Oh et Collmer, 2005), ou la fermeture des stomates chez *A. thaliana* (Melotto et al., 2006).

Afin d'inhiber la croissance *in planta* du pathogène, la plante renforce ses parois cellulaires en augmentant la synthèse de lignine, de protéines de parois riches en glycine (GRP), en proline (PRP) ou en hydroxyproline (HPRP), de subérine et de papilles riches en callose (polymère de D glucose relié par des liaisons  $\beta 1,3$ ) (Hardham et al., 2007). Elle produit également des molécules anti-microbiennes telles que des phytoalexines (Cho and Lee, 2015) ou des peptides antimicrobiens (thionines et défensines) (Castro et Fontes, 2005).

Au niveau cellulaire, se produit un efflux rapide d'ions  $K^+$  associé à une augmentation du pH extracellulaire, ainsi qu'un pic de calcium et un « burst oxydatif ». Celui-ci correspond à la production massive de formes réactives de l'azote (nitric oxyde, NO) et de l'oxygène « ROS » (Reactive Oxygen Species) ou « ROI » (Reactive Oxygen Intermediates), telles que l'anion superoxyde  $O_2^-$ , le radical hydroxyl OH ou le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (Abramovitch et al., 2006 ; Torres et al., 2006).

De nombreuses cascades de signalisation sont ensuite enclenchées. La voie des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases) joue notamment un rôle majeur dans la défense basale (Asai et al., 2002). Ces cascades conduisent à l'activation de facteurs de transcription et à l'expression de nombreux gènes aux fonctions liées à la défense (Abramovitch et al., 2006).

La signalisation et la reprogrammation de l'expression des gènes suite à la reconnaissance de la flagelline ont été intensivement étudiées (Truman et al., 2006). Ainsi, plus de 300 gènes, dont des facteurs de transcription, des protéines jouant un rôle dans la dégradation d'autres protéines,

des protéines liées à la signalisation hormonale, des phosphatases, des kinases, des protéines associées à la modification de la paroi végétale, *etc.*, voient leur expression modifiée en réponse à la perception de PAMPs. Parmi les protéines fortement activées, se trouvent notamment les protéines PR (« Pathogenesis-Related »), qui sont des protéines très stables, résistantes aux protéases végétales et microbiennes. Les protéines PR sont capables d'interagir directement avec des composés structuraux ou des enzymes impliquées dans le pouvoir pathogène de l'agresseur (Van Loon et Van Strien, 1999).

### **1.3.2- Considérations sur les interactions *Xanthomonas*-plantes**

*Xanthomonas* fait partie des Gammaproteobactéries, - associées aux plantes. Ce genre comprend 27 espèces causant des maladies chez plus de 400 hôtes incluant de nombreuses espèces d'importance économique comme le riz, les citrus, le bananier, le chou, la tomate, le poivron et le haricot. Une même espèce comprend parfois plusieurs pathovars (Ryan et al., 2011). Les espèces et les pathovars montrent un haut degré de spécificité par rapport aux plantes hôtes ou tissus de l'hôte : certains sont localisés dans les vaisseaux conducteurs (ex. *X. albilineans*, *X. oryzae* pv *oryzae*, *X. campestris* pv. *campestris*) et d'autres dans les espaces intercellulaires du mésophylle (ex. *X. translucens*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *X. campestris* pv. *armoricae*).

Les maladies causées par *Xanthomonas* spp. débutent souvent par des semences contaminées, ensuite l'agent pathogène peut être propagé par les pratiques culturales. La dispersion des propagules infectieuses peut également se faire par l'irrigation par aspersion et la formation d'aérosols capables de provoquer l'infection sur de courtes distances.

Les bactéries se développent sur les feuilles d'abord en épiphyte puis pénètrent dans les tissus de l'hôte via des hydathodes ou des blessures pour se propager de façon systémique ou à travers les stomates pour coloniser les tissus du mésophylle. L'entrée des bactéries à travers des hydathodes est favorisée par la variation d'humidité. Plusieurs *Xanthomonas* spp. peuvent survivre dans le sol en association aux débris de culture et constituent ainsi une source d'inoculum pour les prochaines cultures (Dar et al., 1993).

### 1.3.2.1- Caractéristiques génomiques des *Xanthomonas* spp.

Les séquences génomiques complètes de 11 *Xanthomonas* sont à date déterminées. Une séquence typique du génome de *Xanthomonas* spp. devrait coder plus de 4000 protéines dont un ensemble commun est responsable de l'acquisition d'énergie et de la plupart des fonctions cellulaires. Deux clusters de gènes associés à la pathogénèse sont rencontrés chez tous les *Xanthomonas* spp. : le cluster *xps* codé pour le système de sécrétion de type II (T2SS) et le cluster *rpf* codé pour les facteurs de régulation de la pathogénèse (Ryan, 2011). Deux autres clusters associés à la pathogénèse sont aussi présents dans le génome de tous les *Xanthomonas* spp. à l'exception de *Xanthomonas albilineans* : il s'agit des gènes de la réponse hypersensible (*hrp*) codé pour le système de sécrétion de type III (T3SS), et les gènes *gum* codés pour la xanthane (un polyccharide extracellulaire).

Des analyses génomiques comparatives révèlent une plasticité extraordinaire du genre *Xanthomonas*. Presque toutes les bactéries du genre ont un chromosome circulaire dont la taille varie de 4.8 Mb à 5.3 Mb avec un contenu en GC de plus de 60% sauf *X. albilineans* qui a une taille de 3.7Mb (Pierreti et al., 2009).

Des variations génétiques additionnelles chez les *Xanthomonas* spp. sont notamment la présence de plasmides chez certaines souches dont la taille varie de moins de 2 kb à 183 kb. Plusieurs d'entre eux portent des gènes qui codent pour des facteurs ou des fonctions associées à la virulence comme les effecteurs de type III, la sécrétion d'enzymes extracellulaires et les systèmes de sécrétion de type IV (T4SSs) (Ryan et al., 2011).

Les informations générées par la séquence du génome de *Xanthomonas* spp. ont permis également d'identifier des gènes codant pour des protéines similaires à des facteurs de virulence connus tel que : a) les effecteurs de type III (Grant et al., 2006) : protéines bactériennes nécessaires à la pathogénèse injectées dans les cellules de la plante hôte à travers le système de sécrétion de type 3 (T3SS, *type III secretion system*), b) les régulateurs à deux composantes (Qian et al., 2008) : mécanisme qui permet à la bactérie de percevoir et de répondre à des changements de facteurs environnementaux, c) les protéines TBDTs : Ton B-dependent transporters (Blanvillain, 2007) : famille de protéines de la membrane de bactérie Gram- leur



permettant de percevoir des signaux environnementaux et de déclencher des changements dans la transcription de gènes et d) les protéines Cyclic di-GMP (Hengge, 2009; Schirmer et Jenal, 2009) : messagers secondaires bactériens impliqués dans la régulation de plusieurs processus cellulaires.

Le terme effecteur de type III provient justement du fait que les effecteurs transitent par le système de sécrétion de type 3. Deux importantes classes d'effecteurs de type III sont connues chez les *Xanthomonas* spp : les effecteurs TAL (transcription activator-like effectors) et les effecteurs non-TAL. Les effecteurs TAL activent l'expression de gène de l'hôte et ont des caractéristiques communes comme la localisation des signaux. Formés de séquences répétées d'environ 34 acides aminés, ils ont un domaine d'activation acide typique des facteurs de transcription et une région centrale leur conférant la spécificité par rapport à la plante hôte et/ou à un tissu particulier (Bogdanove et al., 2010).

Chez certaines plantes, les effecteurs bactériens sont reconnus par les cellules de l'hôte et déclenchent une réponse de résistance appelée réaction d'hypersensibilité (HR), d'où leur nom de gène d'avirulence (avr).

#### **1.3.2.2- Facteurs de virulence associés aux *Xanthomonas* spp.**

Les analyses génomiques comparatives entre les *Xanthomonas* spp. ont révélé la conservation de certains gènes ou clusters associés à la virulence ainsi que des différences génétiques pouvant expliquer leur spécificité à une espèce végétale et/ou à un tissu type.

##### **1.3.2.2.1- Le système de sécrétion de type III (TTSS)**

Le système de sécrétion de type III (TTSS en anglais) a été largement étudié parcequ'il est présent chez des bactéries causant des maladies aux mammifères et aux plantes. Les bactéries biotrophes et hémibiotrophes utilisent le système de sécrétion de type III pour injecter des molécules effectrices qui ciblent la machinerie cellulaire de l'hôte et modulent le métabolisme de la plante pour libérer des nutriments (Fatima and Senthil-Kumar, 2015).

Un grand nombre de bactéries phytopathogènes appartenant au groupe des Gammaproteobacteria interagit directement avec les cellules de la plante hôte au moyen d'effecteurs protéiques aux stades précoces de l'infection (Alfano et Collmer, 2004). Ceux-ci sont sécrétés dans l'apoplasme ou dans le cytoplasme des cellules hôtes par l'intermédiaire d'un système de sécrétion de type III et constituent des facteurs de virulence modulant la susceptibilité de la plante hôte au bénéfice de la bactérie (White et al., 2009).

Les gènes codant pour les effecteurs et les protéines du T3SS sont regroupés au même endroit dans le génome des bactéries : ce sont des îlots de pathogénicité appelés clusters *hrp*. Les gènes *hrp* sont en général situés dans certaines régions potentiellement mobiles du génome (Gürlebeck et al., 2006). Le système de sécrétion de type III est aujourd'hui reconnu comme l'un des éléments majeurs de la virulence des bactéries phytopathogènes : sans leur TTSS, ces bactéries sont incapables de se multiplier *in planta*, provoquer le développement des symptômes de la maladie sur une plante hôte, ainsi que la réaction hypersensible (HR) sur une plante non-hôte ou résistante. (Alfano et Collmer, 2004). Ainsi, cette structure moléculaire est également appelée « système *hrp* », pour « hypersensitive response and pathogenicity », et les gènes codant pour ses constituants « gènes *hrp* ».

Le répertoire des effecteurs de type III est très divers et il est considéré comme étant la base moléculaire de la spécificité d'hôtes (Hajri et al., 2009). Chez *Xanthomonas* spp., environ une quarantaine de groupes d'effecteurs avérés ou potentiels ont été répertoriés (White et al., 2009). La séquence génomique de plusieurs *Xanthomonas* spp. contient un ensemble de 9 gènes codant des effecteurs de type III : *xopR*, *avrBs2*, *xopK*, *xopL*, *xopN*, *xopP*, *xopQ*, *xopX*, *xopZ*. L'exception est faite toutefois pour *X. campestris* pv. *armoraciae*, ayant seulement 6 effecteurs connus et *X. albilineans* pour lequel aucun effecteur n'a encore été décrit (Ryan et al., 2011).

#### **1.3.2.2.2- Les systèmes de sécrétion de type II**

Certaines enzymes de dégradation de la paroi végétale comme la cellulase, la polygalacturonase, la xylanase et protease sont sécrétées par les systèmes de sécrétion de type II (T2SS).

Tous les *Xanthomonas* spp. et des bactéries génétiquement apparentés comme *Xylella fastidiosa* et *Stenophomonas* sp. possèdent un T2SS appelé Xps contribuant à leur virulence. Ce système

de sécrétion a été mis en évidence chez *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *orizae* et *X. euvesicatoria* (Ryan et al., 2011). Un autre T2SS appelé *Xcs* a été trouvé chez certaines espèces incluant *X. campestris* pv. *campestris*, *X. citri* pv. *citri* et *X. euvesicatoria* mais ne semble pas associé à la virulence (Szczesny et al., 2010).

Le génome de tous les *Xanthomonas* spp. possède des gènes codant des enzymes putatives pour la dégradation de la paroi des cellules végétales. Certains gènes comme *cbhA* codant la celobiosidase ont été retrouvés seulement chez des *Xanthomonas* spp. du xylème et *Xylella fastidiosa* tandis que d'autres sont conservés chez toutes les espèces (Ryan et al., 2011). Certains effecteurs de type III codent pour des gènes associés à seulement certaines espèces ou des espèces différentes s'attaquant à des plantes hôtes communes. Par exemple, *xopAL1*, *xopAC*, *xopAD*, *avrXccC* et *xopAL2* sont uniques à *X. campestris*. (Ryan et al., 2011).

#### **1.3.2.2.3- Les adhésines**

Les *Xanthomonas* spp. synthétisent des adhésines qui sont des composantes de la surface bactérienne permettant à la bactérie de s'attacher aux surfaces et contribuent à leur virulence (Das et al., 2009).

Il a été démontré chez *X. oryzae* que certaines adhésines sont préférentiellement impliquées à différents stades de l'infection comme l'attachement à la surface foliaire, l'entrée dans les tissus de la plante, la colonisation et la survie de la bactérie au sein de la plante (Das et al., 2009). Aussi, XadA et XadB sont impliquées dans l'attachement et l'entrée de la bactérie dans la plante hôte et ne jouent aucun rôle dans la colonisation qui s'ensuit tandis que PilQ ne jouant aucun rôle dans l'attachement et l'entrée de la bactérie, est pourtant requise pour la multiplication et la propagation de la bactérie dans les tissus foliaires (Ryan et al, 2011).

#### **1.3.2.2.4- Les lipopolysaccarides et la xanthane**

Les lipopolysaccharides (LPS) et la xanthane (polysaccharide extracellulaire, caractéristique du genre *Xanthomonas*) contribuent à l'habilité de *Xantomonas* spp. à causer des maladies (Qian

et al., 2005). Le cluster de la xanthane comprend 12 gènes (*gumB* à *gumM*) codant des protéines impliquées dans le synthèse et la sécrétion de la xanthane (Chou et al., 1997).

Hormis les informations rapportées sur les facteurs de virulence associés aux *Xanthomonas* spp. en général, peu d'informations spécifiques à *Xcv* est actuellement disponible contrairement au *X. campestris* pv. *campestris* (responsable de la nervation noire des crucifères) ou *Bremia lactuca*, (l'agent du mildiou de la laitue). Toutefois, des métabolites phytotoxiques comme l'acide 3 méthylthiopropanoïque et l'acide trans-3-méthylthiopropenoïque ont été entre autres isolés de *Xcv* (Scala et al., 1996). Des effets toxiques de ces deux composés sur les feuilles de la laitue ont été décrits.

#### **1.4- La résistance chez les plantes**

Les mécanismes de défense varient généralement d'une plante à l'autre car ils sont très souvent le résultat d'une adaptation aux conditions environnementales. Quelque soit le type de défense ou de résistance qu'une plante hôte utilise contre un agent pathogène, il est ultimement contrôlé, directement ou indirectement par le matériel génétique de la plante et du pathogène (Agrios, 2005).

Il faut alors distinguer la résistance horizontale, (dite partielle, polygénique, quantitative) de la résistance verticale (dite monogénique). Deux types de résistance sont à considérer chez la plante : la résistance passive impliquant des barrières préformées ou constitutives et la résistance active impliquant des mécanismes chimiques ou physiques induits en réponse au stress (Benhamou et Rey, 2012).

##### **1.4.1- La résistance passive**

La résistance passive assure la protection de la plante contre des agents pathogènes auxquels elle est confrontée en permanence. Elle existe donc chez toutes les plantes et se divise en deux grandes catégories : les barrières structurales constitutives et les substances chimiques préformées (Benhamou, 2009).

Parmi les barrières constitutives présentes chez les plantes, la cuticule constitue la structure de protection la plus efficace. La cuticule est une zone morte recouvrant les premières couches de cellules vivantes au niveau de l'épiderme. Elle est la première barrière défensive qui limite la pénétration microbienne dans les tissus des végétaux. La cuticule a un comportement hydrophobe dû à sa composition en cutine, un polymère insoluble riche en cires (Jeffree, 1996). Les poils, les trichomes, les épines et les aiguillons constituent d'autres barrières structurales susceptibles de contrer la progression d'un agent pathogène.

Les barrières chimiques constitutives sont fabriquées continuellement, même en l'absence d'agents pathogènes. Ces molécules, appelées phytoanticipines, appartiennent à des classes chimiques diverses, ce sont : les composés phénoliques, les alcaloïdes, les lactones, les saponines, les glycosides cyanogéniques et les huiles. On distingue quatre principales familles de composés phénoliques : les acides phénoliques simples, comme le catéchol et l'acide protocatéchuïque, les flavones, l'acide chlorogénique et les quinones (King et Young, 1999). Les composés phénoliques sont bien connus pour leur potentiel antifongique et antibactérien.

#### **1.4.1.1- Contribution des stomates à la résistance passive**

Les stomates sont des pores microscopiques retrouvés à la surface des feuilles des plantes et sont composés d'une paire de cellules spécialisées appelées cellules de garde (Underwood et al., 2007). À travers les stomates, les plantes font des échanges gazeux avec le milieu extérieur et contrôlent les pertes d'eau en régulant l'ouverture des ostioles.

D'une manière générale, l'ouverture et la fermeture des stomates sont influencées par des facteurs environnementaux comme l'intensité lumineuse, l'humidité relative et la concentration en CO<sub>2</sub> (Fan et al., 2004; Gray, 2005). Les plantes contrôlent la taille des stomates en régulant la pression osmotique des cellules de garde et l'acide abscissique (ABA) est reconnu pour son rôle prédominant dans cette régulation stomatale en réponse aux variations des conditions de l'environnement (Montillet et Hirt, 2013).

Contrairement aux champignons ayant la machinerie enzymatique nécessaire pour digérer la paroi et la cuticule, les bactéries phytopathogènes n'ont pas la capacité de pénétrer directement l'épiderme. Elles doivent par conséquent utiliser des ouvertures naturelles comme : les

hydathodes (ex. *X. campestris* pv. *campestris*), les stomates : (ex. *Pseudomonas syringae*), les nectarthodes (ex. *Erwinia amylovora*) et les lenticelles : (ex *Pectobacterium atrosepticum*) (Huang, 1986). Parmi ces ouvertures naturelles, les stomates sont les pores les plus abondants de la surface foliaire de la plante et représentent par conséquent l'une des voies privilégiées d'entrée des bactéries phytopathogènes dans les feuilles (Gudesblat et al., 2009). À part ces ouvertures naturelles, les bactéries peuvent aussi atteindre les tissus foliaires via des blessures causées par des insectes, des dommages mécaniques et des dégâts causés par la grêle, la rupture de trichomes, la formation de racines latérales et l'abscission des feuilles. Dans le cas de *X. campestris* pv. *vitians*, la pénétration dans la plante hôte se fait principalement via les stomates, des hydathodes ou des blessures (Blancard et al. 2006)

Selon Huang (1986), la morphologie et la structure des stomates peuvent jouer un rôle dans la résistance de l'hôte en limitant la pénétration de l'agent pathogène. McLean (1921) a étudié la structure des stomates de deux espèces de citrus en relation au chancre bactérien des agrumes causé par *X. campestris* pv. *citri* et a montré que la différence observée dans la sensibilité des citrus pouvait être attribuée aux différences morphologiques de la structure des stomates. D'autres études rapportent que le nombre et la taille des stomates peuvent également jouer un rôle dans la résistance des plantes aux maladies.

Chez la tomate (*Lycopersicum esculentum*), il a été démontré que la tache bactérienne causée par *X. campestris* pv. *vesicatoria* a été significativement réduite en provoquant la fermeture des stomates par traitement à l'acide abscissique et l'acétate phénylmercurique avant l'inoculation avec l'agent pathogène. Aussi, la fréquence des stomates sur les faces adaxiales et abaxiales a été corrélée avec le nombre de lésions produites après infection (Ramos et Volin, 1987).

#### **1.4.1.2- Contribution des éléments minéraux à la résistance**

La nutrition minérale de la plante concerne l'ensemble des mécanismes impliqués dans le prélèvement, le transport, le stockage et l'utilisation des ions minéraux nécessaires au métabolisme et à la croissance de la plante. Les connaissances acquises dans ce domaine sont

utilisées pour gérer au mieux la fertilisation des cultures de façon rationnelle et durable (Maurot-Gaudry, 2013). Toutefois, de nombreuses questions concernant les interactions entre les éléments nutritifs et les systèmes plante-pathogène demeurent sans réponse (Hubber, 1996). Les éléments minéraux sont essentiels pour la croissance et le développement des plantes et des microorganismes et sont aussi reconnus comme d'importants facteurs dans le devenir des interactions des plantes et des microorganismes bénéfiques ou pathogènes (Thalineau et al., 2018).

Plusieurs études ont montré qu'une bonne gestion de la nutrition des plantes permet de mieux contrôler les maladies et ainsi d'obtenir de meilleur rendement (Dordas, 2009). Les éléments nutritifs peuvent affecter la résistance ou la tolérance des plantes aux maladies (Graham et Webb, 1991). Tous les éléments nutritifs essentiels peuvent affecter la sévérité des maladies (Hubber et Graham, 1999). Certaines plantes sont dotées de la capacité d'accumuler de fortes quantités d'éléments minéraux dans le sol, ce qui constitue en partie une stratégie de défense contre les agents pathogènes (Tewes et al., 2018).

Lorsqu'une plante est infectée par un agent pathogène, sa physiologie est altérée, particulièrement l'absorption, l'assimilation et la translocation des éléments minéraux. Il existe des agents pathogènes capables d'immobiliser des éléments nutritifs dans la rhizosphère ou dans les tissus infectés. D'autres peuvent s'interférer à la translocation et peuvent causer des problèmes de déficience ou de toxicité (Hubber et Graham, 1999).

L'effet de l'azote (N) sur les maladies, tel que rapporté dans la littérature, est variable et dépend du pathogène. Aussi, il a été rapporté que la sévérité des maladies augmente avec de forte teneur en azote pour les parasites obligatoires tel que *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Hoffland et al, 2000) et diminue pour les parasites facultatifs tel que *X. vesicatoria* (Chase, 1989).

Le potassium (K) diminue pour sa part la sensibilité des plantes aux agents phytopathogènes par ses fonctions métaboliques (Dordas, 2009). Il peut contribuer à renforcer la paroi des cellules épidermiques et prévenir l'attaque par des agents pathogènes. La déficience en K chez la plante peut affecter la synthèse des protéines en favorisant l'accumulation de formes simples d'azote assimilables par des agents pathogènes. Il a été démontré que le K peut réduire la sévérité de plusieurs maladies causées par des parasites obligatoires et facultatifs tels que *X. oryzae* sur le

riz (Chase, 1989) et *X. campestris* pv. *malvacearum* sur le coton (Hubber et Graham, 1999; Sharma et al., 2005; Dordas, 2009)

Le calcium (Ca) affecte la susceptibilité des plantes aux maladies de 2 façons différentes (Dordas, 2009). Premièrement, le Ca est important pour la stabilité et le fonctionnement de la membrane. En cas de déficience en Ca, la membrane peut laisser passer des composés de faible poids moléculaires comme les sucres, les acides aminés en provenance du cytoplasme et l'apoplasme. Ces molécules, en servant de nutriments aux agents pathogènes, peuvent stimuler l'infection (Marschner, 1995). D'un autre côté, le Ca est un élément important de la structure et de la stabilité de la paroi des cellules où les polygalacturonates sont nécessaires au niveau de la lamelle moyenne. Aussi, de faibles teneurs en Ca dans les tissus des plantes augmentent leur susceptibilité aux pertes post récoltes (Dordas, 2009).

Pour les maladies fongiques par exemple, il a été rapporté que le Ca confère de la résistance contre *Pythium*, *Sclerotinia*, *Fusarium* et *Botrytis* (Graham, 1983).

L'effet des microéléments et des oligoéléments dans la réduction de la sévérité des maladies des plantes peut être attribué aux rôles qu'ils jouent dans la physiologie et la biochimie des plantes d'où leur implication à plusieurs processus affectant la réponse des plantes aux maladies (Marschner, 1995). La réduction de la sévérité de certaines maladies a été rapportée chez le concombre après une simple aspersion foliaire de  $H_3BO_3$ ,  $CuSO_4$ ,  $MnCl_2$ , ou  $KMnO_4$  leur conférant une protection systémique contre le mildiou (Reuveni et Reveuni, 1998). Ce même auteur a suggéré que l'application des oligoéléments comme le Mn, le Cu et le B peut favoriser la libération de cations  $Ca^{2+}$  de la paroi qui interagissent avec l'acide salicylique et activent les mécanismes du SAR. Le manganèse (Mn) est important dans la protection des plantes contre les microorganismes par son rôle dans la photosynthèse et la biosynthèse de la lignine et des phénols. Le manganèse contrôle la biosynthèse de la lignine et de la subérine (Römhelt et Marschner, 1991) par l'activation d'enzymes comme ceux du sentier métabolique de l'acide shikimique et des dérivés du phénylpropanoïde. Il a été montré que des applications du Mn dans le sol réduisent la gale commune de la pomme de terre causée par *Streptomyces scabies* (Keinath et Loria, 1996)

Le zinc (Zn) a été rapporté pour ses différents effets sur la susceptibilité des plantes (Graham et Webb, 1991). Dans certains cas, l'application du zinc peut réduire la sévérité des maladies par



ses effets directement toxiques pour l'agent pathogène. Il joue aussi un rôle important dans la synthèse des protéines et une faible teneur en Zn chez la plante induit l'accumulation d'acides aminés et réduit la taille des tissus foliaires (Marschner, 1991). Étant un cofacteur de la superoxyde dismutase (Keller, 2010), le zinc joue un rôle dans la protection de la membrane plasmique contre les dommages oxydatifs par la détoxification de radicaux de superoxydes (Calmak, 2000).

Le cuivre (Cu) est essentiel à la photosynthèse, la respiration mitochondriale, le métabolisme du carbone et de l'azote et la protection contre le stress oxydatif (Hänsch and Mendel, 2009). Le Cu a été longtemps utilisé pour ses effets antimicrobiens. Ses effets bactéricides sont connus et se manifestent particulièrement par une perte de l'intégrité de la membrane, des dommages au niveau de l'ADN et l'inhibition de la respiration (Fones and Preston, 2013)

Le bore (B) a une fonction directe dans la structure et la stabilité de la paroi, ce qui explique son effet bénéfique dans la réduction de la sévérité des maladies (Dordas, 2009). Hormis son rôle dans la structure de la paroi, le B intervient dans la perméabilité et la stabilité de la membrane et le métabolisme de la lignine et des composés phénoliques (Brown et al., 2002).

Le fer (Fe) pour sa part diffère des autres microéléments comme le Mn, le Cu et le B pour lesquels les microorganismes ont de faibles besoins (Dordas, 2009). Aussi l'apport de Cu, Mn et B dans un sol déficient est généralement bénéfique à la plante hôte mais l'apport du Fe peut se révéler positif ou négatif pour la plante hôte. Le Fe joue un rôle dans l'activation d'enzymes impliqués soit dans l'infection de la plante hôte ou dans la défense. Le Fe s'est révélé efficace pour réduire la sévérité de plusieurs maladies fongiques comme la rouille du blé et celle causée par *Colletotrichum musae* sur le bananier (Graham et Webb, 1991). L'application foliaire du Fe peut augmenter la résistance du pommier et du poirier contre *Sphaeropsis malorum* et du chou contre *Olpidium brassicae* (Graham, 1983). Le Fe peut aussi favoriser la synthèse d'antibiotiques fongiques par des bactéries du sol (Graham et Webb, 1991).

À part les éléments nutritifs essentiels pour la croissance et le développement des plantes, d'autres éléments susceptibles d'être présents sous forme de trace dans les tissus des plantes comme (Li, Na, Be, Ge, F, I, Co, Cr, Cd, Pd et Hg) peuvent occasionnellement être impliqués dans les relations plantes pathogènes (Dordas, 2009). Par exemple le Li et le Cd sont connus

pour leurs effets supprimeurs sur les oidiums. Le Cd et le Hg peuvent être impliqués dans la synthèse de la lignine chez le blé (Graham et Webb, 1991).

Quelques exemples des plus communs d'interactions d'éléments nutritifs et maladies des plantes ont été rapportés dans le cas de *Streptomyces scabies* de la pomme de terre, le *Verticillium*, le *Fusarium* (Huber et Graham, 1999). Dans le cas de *Streptomyces* spp., il a été rapporté que certaines pratiques culturales comme la rotation et l'épandage des résidus de culture peuvent contribuer à augmenter la disponibilité du Mn dans le sol, ce qui réduit l'incidence de la maladie (Dordas, 2009).

#### **1.4.2- La résistance active**

La manifestation de la résistance active débute généralement par la réaction d'hypersensibilité (RH) (Lepoivre, 2003). La réaction RH est une réaction spécifique basée sur le concept gène pour gène de Flor, dans laquelle le produit du gène d'avirulence (*Avr*) du pathogène est reconnu par le produit du gène de résistance (*R*) de la plante (Klarzynski et Fritig, 2001). Il s'agit d'une résistance génétique se manifestant par la mort de la cellule hôte qui, avant de s'autodétruire, aura émis des signaux d'alerte vers les cellules voisines pour créer une zone de résistance locale acquise (RLA). Cette première ligne de défense active est très efficace pour confiner le pathogène et retarder l'invasion des tissus de la plante. La propagation des signaux et la synthèse des molécules de défense peuvent se généraliser à la plante entière. Il s'agit de la résistance systémique acquise (RSA) qui protège la plante non seulement contre une attaque pathogène immédiate mais aussi contre de futures infections (Oliveira et al., 2016). L'induction de la RSA prépare la plante pour une réponse plus robuste aux infections subséquentes. La RSA implique la génération rapide de signaux au niveau du site primaire d'infection, qui sont transportés de manière systémique aux autres parties de la plante probablement via le phloème. Un ensemble chimiquement divers d'inducteurs de RSA a été déjà identifié (Shine et al. 2018), incluant des hormones (l'acide salicylique, le méthyle salicylate), des métabolites primaires et secondaires (l'oxide nitrique, des espèces réactives d'oxygène, le glycerol-3-phosphate, l'acide azélaïque, l'acide pipécolique, le dihydroabétinal), des acides gras et des protéines (Shine et al. 2018).

#### **1.4.2.1. Les composantes de la résistance induite**

La caractérisation précise des produits de gènes de défense a permis d'établir l'existence de 3 principales composantes de la résistance induite: 1) Les composés structuraux destinés à réparer le plus rapidement possible une paroi endommagée par les enzymes hydrolytiques d'origine microbienne; 2) les protéines de défense incluant les enzymes, les protéines de stress et les inhibiteurs d'enzymes; et 3) les composés issus du métabolisme secondaire ou phytoalexines (Benhamou, 2009). Toutes ces molécules exercent un rôle antimicrobien direct ou indirect et agissent en synergie dans un contexte où la vitesse et l'amplitude de la réponse globale sont des paramètres clés dans le devenir de la relation plante-agent pathogène (Benhamou et Picard, 1999).

##### **1.4.2.1.1. La formation des barrières structurales**

Les barrières structurales élaborées par les plantes en réponse à l'infection par un agent pathogène ont en premier lieu pour but de consolider la paroi et la rendre imperméable à la diffusion de substances délétères produites par le microorganisme (enzymes hydrolytiques, toxines, antibiotiques). La plante va donc renforcer sa muraille extérieure pour, au moins, retarder l'agent pathogène dans sa progression avant d'activer sa deuxième ligne défensive qui comprend un ensemble de molécules au pouvoir antimicrobien (Benhamou, 2009).

La formation de papilles et plus généralement d'appositions pariétales est un phénomène couramment rencontré dans de multiples interactions plante-microorganisme, que l'agent infectieux soit biotrophe ou nécrotrophe (Kunoh et al., 1996). Des analyses ont permis d'établir un profil type de la composition chimique des papilles. Dans ce profil, la callose, polysaccharide composé de molécules de glucose en liaison  $\beta$ -1,3, était le composé présent dans tous les cas étudiés. Les autres composés incluent les composés phénoliques (ex. la lignine), des protéines, des glycoprotéines (ex. glycoprotéines riches en hydroxyprolines : HRGPs), occasionnellement de la pectine et des éléments chimiques inorganiques comme la silice, le calcium, le magnésium et le manganèse (Benhamou et al., 2009).

La callose est très souvent synthétisée dans les papilles mises en place rapidement après détection d'un pathogène, comme dans l'interaction incompatible coton-*X. campestris* pv. *malvacearum* (Dai et al., 1996) ou laitue-*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Bestwick et al., 1995).

Dans le cas des interactions plante-bactérie, il a été montré que les papilles formées par *Arabidopsis* en réponse à des pathogènes hétérologues (*P. syringae* pv. *glycines* ou *P. syringae* pv. *phaseolicola*) sont probablement enrichies en lignine car ces différentes bactéries induisent l'expression de la PAL et d'une enzyme de synthèse de lignine (BCB, Blue Copper-Binding protein, type laccase) (Mishina et Zeier, 2007).

Dans le cas de laitue, les mécanismes de résistance impliquant la production et le dépôt de callose ont été rapportés dans le cas de *Plasmopara lactucae-radicis*, responsable du mildiou racinaire de la laitue. La résistance de la laitue à ce champignon a été attribuée à un dépôt de callose autour de l'haustoria du champignon. Le traitement d'un cultivar résistant avec le 2-deoxy-D-glucose, un inhibiteur de la synthèse de la callose, résultait à la susceptibilité de ce cultivar au champignon (Stanghelli et al., 1993).

#### **1.4.2.1.2- Les protéines de stress ou protéines PR**

La réponse des plantes aux attaques des microorganismes est complexe et implique l'induction de l'expression d'un grand nombre de gènes codant pour des protéines diverses dont beaucoup peuvent avoir un rôle direct dans la défense. La résistance systémique acquise est caractérisée par l'accumulation d'acide salicylique et de protéines reliées à pathogenèse (PR : pathogenesis-related) qui servent de marqueurs du phénomène (Sarosh et al. 2005). Ces protéines PR sont actuellement classées en 17 groupes selon leurs propriétés biochimiques et moléculaires et sont définies comme protéines codées par la plante hôte, mais induites spécifiquement dans des situations pathologiques. Elles ne s'accumulent pas seulement localement dans le secteur infecté mais sont également induites systémiquement (Van Loon et Van Strien, 1999).

L'induction de la résistance systémique acquise (RSA) a ainsi été associée à l'augmentation d'enzymes hydrolytiques telles que  $\beta$ -1,3-glucanases (PR-2) et chitinases (PR-3, PR-4, PR-8 et

PR-11) qui sont capables de détériorer les parois de cellules fongiques ou bactériennes (Andreu *et al.* 2006).

Chez la laitue, il a été démontré que l'acybenzolar S-méthyl (ASM) induit de la résistance à *X. campestris* pv. *vitians* notamment par une augmentation de l'activité de la chitinase (Yigit, 2011).

#### **1.4.2.1.3- Les phytoalexines**

Les phytoalexines sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire qui sont synthétisés par la plante lors de stress biotiques ou abiotiques (Benhamou et Rey, 2012). L'accumulation de phytoalexines a été largement décrite dans le cas de la SAR chez beaucoup d'espèces végétales. Ces composés s'accumulent dans les tissus de la plante à l'emplacement d'infection ou de pénétration d'un agent pathogène, permettant ainsi de réduire ou de stopper sa progression en désorganisant et en tuant ses cellules. Dans certains cas, la rapidité de l'accumulation des phytoalexines est associée à la résistance de la plante face à la maladie causée par une bactérie ou un champignon (Hammerschmidt 1999).

Les phytoalexines appartiennent à des familles chimiques différentes selon les plantes, par exemple, des isoflavonoïdes chez les légumineuses, des sesquiterpènes chez les solanacées (Harborne 1999), des coumarines chez les Euphorbiacées (Giesemann *et al.* 1986) et des diterpènes chez les Ulmacées (Dumas *et al.* 1983). Plus de 350 phytoalexines appartenant à au moins 30 familles de plantes différentes ont été isolées et caractérisées en termes de la structure et de la fonction (Benhamou et Rey, 2012). Chez la laitue, il a été démontré que la lettucenin A est la principale phytoalexine produite après l'utilisation d'éliciteurs biotiques ou abiotiques comme le CuSO<sub>4</sub> ou le AgNO<sub>3</sub> (Yean, 2009; Benett *et al.*, 1994). Son rôle dans la résistance de la laitue contre *X. campestris* a été également prouvé (Yean, 2009).

#### **1.4.2.2- Les gènes de résistance R chez les plantes**

La résistance aux maladies est souvent déterminée par les gènes de résistance R (*R genes*) (McHale *et al.*, 2009). Plus de 70 gènes de résistance ont à date été caractérisés au niveau

moléculaire chez différentes espèces végétales (Liu et al., 2007). Cinq domaines structuraux majeurs se retrouvent chez ces gènes (Benhamou, 2009) :

- a) Un domaine LRR « Leucine-Rich Repeats » constitué de répétitions multiples d'un motif d'environ 24 résidus aminoacyles. Ce domaine serait un récepteur pour les facteurs d'avirulence. (Jones et Jones, 1997)
- b) Un domaine Sérine/Thréonine kinase (Ser/Thr kinase), possiblement impliqué dans les réactions de phosphorylation en chaîne.
- c) Un domaine de liaison du nucleotide (NBS, Nucleotide Binding Site) qui est présent chez de très nombreuses protéines comme les sous unités  $\beta$  d'ATPase, les protéines Ras ou encore des adénylates kinases. Ce domaine correspond à un site de fixation et d'hydrolyse des nucléotides triphosphate, ATP et GTP.
- d) Un domaine Leucine Zipper (LZ) associé à l'homo- et à l'hétérodimérisation des facteurs de transcription eucaryote (Bent, 1996). Leur rôle suggéré serait donc de favoriser la dimérisation ou l'interaction avec d'autres protéines.
- e) Un domaine Toll Interleukin Receptor (TIR) impliqué dans la signalisation cellulaire.

Des études récentes ont montré que ces domaines jouent un rôle important dans les interactions des protéines R avec les effecteurs protéiques des agents pathogènes et dans l'activation des voies de transduction du signal de l'immunité innée (Liu et al., 2007). L'un des premiers gènes de résistance R à avoir été cloné est le gène *Pto* conférant une résistance envers *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* exprimant le gène *avrPto* (Benhamou, 2009).

#### **1.4.2.2.1- Cas de la laitue**

Les travaux sur l'architecture génomique de la résistance chez la laitue publiés par McHale et ses collègues (2009) ont rapporté plus de 42 000 gènes provenant de *Lactuca sativa* cv Salinas et *L. serriola* (accession UC96US23).

Ces auteurs ont identifié plus de 700 gènes candidats de résistance (*RGCs*), impliqués dans la reconnaissance de pathogène, la transduction de signal, les réponses de défense ou de susceptibilité aux maladies. Des études plus récentes ont rapporté 1134 gènes du cultivar Salinas

potentiellement impliqués dans la reconnaissance des agents pathogènes (Christopoulou et al., 2015). La résistance phénotypique de la laitue est en grande partie génétiquement associée aux *RGCs* (McHale et al., 2009). Les gènes candidats de résistance (*RGCs*) ou gènes analogues de résistance (*RGAs*) sont des gènes présentant des séquences similaires aux NBS-LRR et d'autres classes de résistance *R* et jouant un rôle important dans la reconnaissance de l'agent pathogène. Ainsi, la capacité d'un *RGC* à reconnaître une molécule effectrice bactérienne résulte au déclenchement des mécanismes de défense de la plante (Jones, 2006).

Chez la laitue, environ une vingtaine de gènes de résistance à des maladies incluant les maladies bactériennes, virales et fongiques ont été clonés (Michelmore et Meyer, 1998). Souvent, les gènes de résistance sont localisés dans des régions complexes, hautement dupliquées contenant plusieurs gènes de résistance. C'est le cas du cluster *Cf* chez la tomate, du locus *Xa21* chez le riz et des clusters *Dm* chez la laitue (Michelmore et Meyer, 1998). À date, les gènes de résistance identifiés chez la laitue sont majoritairement des gènes *Dm* (*Dm2*, *Dm3*, *Dm7*, *Dm11*, *Dm7* etc) dirigés contre le mildiou de la laitue causé par *Bremia lactucae*.

D'autres gènes de résistance à d'autres agents pathogènes ont été identifiés chez la laitue comme *mol* conférant la résistance au virus de la mosaïque de la laitue et *cor* conférant la résistance à *Rhizomonas suberifaciens* (Michelmore et Meyer, 1998).

Des études antérieures ont identifié 25 loci chez la laitue qui contribuent à sa résistance aux maladies causées par des agents phytopathogènes comme *Bremia lactuca*, *Plasmopara lactuca-radiciis*, *Sphingomonas suberifasciens*, lettuce mosaic virus (LMV), Turnip Mosaic Virus (TuMV), Tomato bushy Stunt Virus (TBSV) et *Pemphigus bursarius* (McHale, 2009). Cette résistance aux autres agents pathogènes de la laitue est souvent déterminée par des gènes candidats de résistance (*RGCs*) qui codent pour des protéines NB-LRR (nucleotide-binding site leucine-rich repeat).

Dans le cas de *Xcv*, jusqu'à très récemment, des informations sur les gènes de résistance à la TBL étaient assez superficielles. Toutefois, des études très récentes ont identifié chez la laitue le gène *Xar1* (*Xanthomonas resistance 1*) présent dans une région génomique contenant plusieurs NB-LRR codés par des *RGCs* (Hayes et al., 2014). Le gène *Xar1* confère une forte résistance à la TBL en serre et plein champ selon les études de Hayes et ses collègues. Ce gène, porté par le chromosome 2, a été identifié notamment chez le cultivar La Brillante montrant une

réaction d'hypersensibilité vis-à-vis de la TBL. Il serait également responsable de la résistance à la TBL chez les cultivars Little Gem et Pavane montrant également une réaction d'hypersensibilité à la TBL (Hayes et al., 2014).

#### **1.4.2.3- Les gènes d'avirulence Avr chez les bactéries phytopathogènes**

Les protéines d'avirulence sont des effecteurs particuliers, reconnus par les protéines R de la plante hôte; cette reconnaissance dite « gène pour gène » entraîne une réaction hypersensible et aboutit à la résistance totale de la plante. Chez les bactéries, une série de gènes d'avirulence a été identifié en particulier chez les *Pseudomonas* et les *Xanthomonas* spp. (Benhamou, 2009). Le premier gène d'avirulence identifié et cloné est le gène *avrA* de *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Staskawicz et al., 1984). Dans la très grande majorité des cas, les protéines d'avirulence sont des substrats du système de sécrétion de type III. Un appareil de sécrétion fonctionnel est alors nécessaire à l'injection de ces protéines, donc à leur activité dans la cellule végétale.

Toutefois, un cas de gène d'avirulence TTSS-indépendant a été récemment rapporté : la protéine AvrXa21 de *X. oryzae* pv. *oryzae*, qui est responsable de l'avirulence de cette bactérie sur les cultivars de riz possédant le gène de résistance Xa21, semble en effet être sécrétée par le système de sécrétion de type I (Lee et al., 2006).

Le gène d'avirulence *avrBs1* a été rapporté également chez *Xcv* et *X. campestris* pv. *campestris*. Les 2 pathovars induisent une réaction d'hypersensibilité sur le cultivar de piment ECW10R (Ronald et Staskawicz, 1988). Le tableau 1.2 présente quelques exemples de gènes de résistance et de gènes d'avirulence clonés.



**Tableau 1.2 : Quelques exemples de gènes de résistance et de gènes d'avirulence clonés**

Espèce	Agent pathogène	Gène de résistance	Gène d'avirulence
Poivron	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Bs1</i>	<i>avrBs1</i>
Tomate	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Xv3</i>	<i>avrXv3</i>
Arabidopsis	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>BsT</i>	<i>avrBsT</i>
Riz	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	<i>Xa21</i>	<i>avrXa21</i>
Tomate	<i>X. campestris</i> pv. <i>armoraciae</i>	<i>Bs4</i>	<i>AvrBs4</i>
Coton	<i>X. campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	<i>B1</i>	<i>avrB6</i>
Laitue	<i>X. campestris</i> pv. <i>vitians</i>	<i>Xar1</i>	??

Source : Benhamou, 2009 et Blanvilain 2007

#### 1.4.2.3- Rôle des stomates dans la résistance active

Les stomates ont été historiquement considérés comme des structures ne jouant qu'un rôle passif dans l'infection des plantes par des pathogènes. Toutefois des études plus récentes ont montré que les stomates ont un rôle plus complexe et dynamique dans la protection des plantes contre les agents phytopathogènes (Melotto et al., 2006; Melotto et al., 2008; Underwood et al., 2007; Gudesblat et al., 2009). Il a été démontré que les cellules de garde des stomates sont capables de percevoir la présence de bactéries phytopathogènes ou saprophytes et entraîner la fermeture des stomates après 1 h environ d'exposition à la suspension bactérienne. Dans ses expériences, Melotto et al., (2006) a utilisé des plants d'*Arabidopsis* chez lesquels 70-90% des stomates sont ouverts. L'inoculation des feuilles d'*Arabidopsis* avec la souche DC3000 de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, une souche virulente pour la tomate et *Arabidopsis*, a provoqué la diminution du nombre de stomates ouverts (de 80% à 30%) après 1 à 2 h d'incubation respectivement. Tandis que le nombre de stomates ouverts était le même chez les feuilles incubées avec de l'eau. Le phénomène a été toutefois passager car après 3 h d'incubation, les stomates se sont rouverts, favorisant la pénétration de l'agent pathogène.

Des essais similaires ont été réalisés en inoculant *Arabidopsis* avec *Escherichia coli* O157 : H7, une bactérie non phytopathogène, la fermeture des stomates a persistée pendant la durée de l'expérience soit 4-8 h.

Les motifs moléculaires associées aux pathogènes (PAMPs : pathogen associated molecular patterns) sont connus pour leur aptitude à stimuler le système immunitaire inné des plantes et des animaux. Il a été démontré que des PAMPs comme la flagelline (flg22), le lipopolysaccharide (LPS) sont impliqués dans la fermeture des stomates chez *Arabidopsis* (Underwood et al, 2007 Melotto et al, 2006; Gudesblat et al, 2009 Zeng et al., 2010; Montillet et Hirt, 2013). Il a été rapporté que l'implication de flg22 dans la fermeture des stomates dépend du récepteur FLAGELLIN-SENSING2 (FLS2) de la plante (Montillet et Hirt, 2013).

D'autres parts, les bactéries phytopathogènes peuvent coder un facteur de virulence leur permettant de surmonter la défense stomatale en supprimant la fonction immunitaire innée des stomates. Melotto et ses collègues (2006) ont montré également que la coronatine (COR) est nécessaire et suffisante pour supprimer la défense stomatale chez *Arabidopsis*, favorisant ainsi l'entrée des bactéries dans la plante (Melotto et al., 2006; Underwood et al., 2007). La coronatine est une phytotoxine non spécifique dont la structure est similaire aux jasmonates incluant l'acide jasmonique retrouvés chez les plantes. Elle est sécrétée par des souches virulentes de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Montillet et Hirt, 2013) et environ 4 autres pathovars de *P. syringae* (Bender et al., 1999). Il a été démontré que dans le cas de la souche virulente *Pst* DC3000, la COR diffusible a été sécrétée dans l'apoplasme des feuilles d'*Arabidopsis*, 3 h après leur infection, ce qui a provoqué la réouverture des stomates en augmentant par conséquent le nombre de sites de pénétration de l'agent pathogène (Underwood et al., 2007). *Pst* DC3000 est capable aussi d'injecter des effecteurs du système de sécrétion de type 3 (TTSS) au niveau des cellules du mésophylle pour supprimer la défense de l'hôte (Cui et al, 2005).

À date, la fermeture des stomates comme stratégie de défense des plantes a été mise en évidence dans d'autres pathosystèmes. Il a été démontré que l'ouverture des stomates de la tomate est affectée de façon similaire à celle d'*Arabidopsis* en réponse au *Pst* DC3000. De même, *P. syringae* pv. *tabaci*, une souche ne produisant pas de COR, induit également la fermeture des stomates (Melotto et al., 2006). Ces informations suggèrent que la fermeture des stomates pourrait être une réponse de défense commune aux plantes, initiée par la perception des PAMPs

bactériens. Le phénomène de réouverture des stomates a été également observé chez d'autres couples plante/ agent phytopathogène. C'est le cas de *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) sur *Arabidopsis* où il a été constaté que cet agent pathogène peut aussi contourner la défense stomatique en provoquant la réouverture des stomates (Gudesblat et al., 2008).

### **1.5- Moyens de lutte contre la TBL**

Les maladies bactériennes sont problématiques au Canada et à travers le monde puisque très peu de bactéricide sont homologués à cette fin dans la laitue. Le confine extra a été homologué en 2017 au Canada pour seulement la laitue feuille. Les bactéricides utilisés dans d'autres cultures légumières sont majoritairement à base de cuivre et représentent une alternative peu souhaitable à cause de l'effet phytotoxique sur la laitue (Carisse et al, 2000). Les recommandations se limitent à des mesures prophylactiques afin de limiter la dispersion de cette bactériose. Une bonne gestion de la TBL repose alors sur : l'utilisation de semences saines, les bonnes pratiques culturales et l'utilisation de cultivars résistants. Une autre alternative consiste à utiliser des stimulateurs de défenses naturelles capables d'induire des mécanismes de défense chez la plante. L'acibenzolar-S-méthyl est un activateur de la résistance systémique acquise utilisé sur la laitue contre *Xcv* (Yigit, 2011).

D'autres approches utilisant des produits comme le resorcinol, l'acide propionique, le mannitol et le tanos ont été rapportées dans la littérature (Fayette et al., 2016). Aussi, une synergie d'interactions entre le tanos et le resorcinol, le tanos et le cuivre ou le resorcinol et le cuivre a été démontrée dans le contrôle de la TBL par Fayette et al. (2016). Le mélange de tanos et de cuivre (1,2 g/l et 0.6 g/l) a ainsi permis de réduire de 72% la sévérité de la TBL comparé au témoin.

### **1.6- Justification de cette étude**

Considérant que le manque de diversité génétique dans l'agriculture moderne contribue à la vulnérabilité des plantes aux épidémies (Kapos et al., 2019), une approche visant à identifier de nouveaux facteurs de résistance variétale constitue une étape fondamentale et pourrait

ultérieurement contribuer au développement de cultivars de laitue plus résistants pour une production économiquement et écologiquement plus durable. Notre étude s'inscrit alors dans le cadre de cette perspective et les objectifs poursuivis sont énumérés plus loin.

### 1.7- Hypothèse du projet

En tenant compte des éléments développés dans la revue bibliographique, l'hypothèse peut être ainsi formulée : *La tolérance des cultivars de laitue à la tache bactérienne est influencée par des facteurs génétiques, physicochimiques et biochimiques propres à la plante hôte et ces facteurs varient selon les différents cultivars, ce qui influence la dynamique de l'agent pathogène et par conséquent l'expression des symptômes.*

### 1.8- Objectifs

*Identifier des facteurs inhérents aux cultivars de laitue qui contribuent à leur résistance à la TBL. Plus spécifiquement :*

- *Étudier le comportement des cultivars face à la TBL en vue d'établir des groupes de résistance;*
- *Déterminer et comparer la dynamique de population de Xcv et Bacillus sp. sur dix cultivars de laitue montrant des niveaux de tolérance variables à la TBL;*
- *Étudier les caractéristiques des stomates de ces dix cultivars en vue d'établir les relations entre leur densité, leur taille et la sévérité à la TBL;*
- *Comparer la composition ionomique des cultivars à l'étude en vue d'identifier les éléments minéraux et/ou les balances qui auraient un impact sur la tolérance à la TBL;*
- *Étudier l'effet de l'infection avec Xcv sur les balances.*

## CHAPITRE 2

### **Relations entre les populations de *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, les densités de stomates et la résistance de la laitue à la tache bactérienne.**

#### **2.1- Introduction de l'article et contributions des auteurs**

La résistance de 10 cultivars de laitue à la tache bactérienne causée par le *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* (*Xcv*) a été évaluée en vue d'établir la relation entre la densité stomatique, les variations de la taille de la population pathogène, et la présence du *Bacillus* sp. Sur la base de l'indice moyen de sévérité de la maladie classée sur une échelle de 0 à 6, les cultivars ont été divisés en trois groupes: tolérant, avec un indice de 2.09; intermédiaire: 3.59; et sensible: 4.92. La population initiale de l'agent pathogène a augmenté légèrement, de moins de 1 logCFU g<sup>-1</sup> après 14 jours de croissance, seulement pour les cultivars tolérants 'Batavia Reine des Glaces' et 'Little Gem'. Contrairement à celle du *Xcv*, la population initiale du *Bacillus* sp. a diminué pour tous les cultivars, de 1 à plus de 2 logCFU g<sup>-1</sup>, sans relation significative avec les groupes de résistance. Les cultivars tolérants présentaient des moyennes de 40 et 57 stomates/mm<sup>2</sup> sur les faces adaxiales et abaxiales des feuilles, respectivement. Ces moyennes étaient significativement inférieures à celles des cultivars sensibles, avec respectivement 67 et 111 stomates/mm<sup>2</sup>. Cependant, la surface stomatique des cultivars variait de 110 à 263 µm<sup>2</sup> et de 126 à 232 µm<sup>2</sup> sur les faces adaxiales et abaxiales des feuilles, respectivement. Par conséquent, aucune relation n'a pu être établie entre la surface stomatique et la sensibilité des cultivars de laitue. La densité des stomates semble être un bon critère pour prédire le degré de tolérance des cultivars, surtout quand on considère la face adaxiale des feuilles.

**Mots clés :** dynamique des populations, *Lactuca sativa*, résistance

Les travaux sont présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'un article scientifique publié dans la section génétique et résistance du « Canadian Journal of Plant Pathology » le 14 août 2018, volume 40, pages 399-407 (référence : <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1495269>).

Les expériences sur le comportement des cultivars de laitue à la TBL et les dynamiques de population de *Xcv* et *Bacillus* sp. ont été réalisées par Olbert Nicolas au Centre de Recherche et de Développement de Saint-Jean-sur-Richelieu. Les expériences sur les stomates ainsi que les analyses statistiques et l'interprétation des résultats ont été également réalisées par Olbert Nicolas à l'Université de Sherbrooke. Vicky Toussaint a agi comme conseillère à la mise en place des méthodes expérimentales et à l'élaboration des méthodes d'évaluation de la TBL. Sylvie Jenni a contribué à l'élaboration du projet de recherche et à la révision du manuscrit. Marie Thérèse Charles a contribué à la planification des essais et à la révision critique du manuscrit. Finalement Carole Beaulieu a agi comme Directrice de recherche, conseillère à la planification des travaux et superviseure dans la rédaction de ce manuscrit.

**Relationships between *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* population sizes, stomatal density and lettuce resistance to bacterial leaf spot**

**OLBERT NICOLAS<sup>1,2</sup>, MARIE THÉRÈSE CHARLES<sup>2</sup>, SYLVIE JENNI<sup>2</sup>, VICKY TOUSSAINT<sup>2</sup> AND CAROLE BEAULIEU<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Département de biologie, Université de Sherbrooke, 2500 boul. de l'université, Sherbrooke, QC, J1K 2R1, Canada*

<sup>2</sup>*Agriculture and Agri-Food Canada, Saint-Jean-sur-Richelieu Research and Development Centre, 430 boul. Gouin, Saint-Jean-sur-Richelieu, J3B 3E6, QC, Canada*

(Accepted 20 June 2018)

Correspondence to: Carole Beaulieu E-mail: [Carole.Beaulieu@USherbrooke.ca](mailto:Carole.Beaulieu@USherbrooke.ca)

© 2018 The Canadian Phytopathological Society

Published online 14 Aug 2018

## 2.2 Abstract

The resistance of 10 lettuce cultivars to bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* (*Xcv*) was evaluated to establish the relationship between stomatal density, variations in pathogen population size, and the presence of epiphytic *Bacillus* sp. On the basis of average disease severity index ranked on a scale from 0 to 6, the cultivars were divided into three groups: tolerant, with 2.09; intermediate, with 3.59; and susceptible, with 4.92. The initial inoculum population of the pathogen was slightly increased, by less than 1 logCFU g<sup>-1</sup> after 14 d, on only the tolerant cultivars ‘Batavia Reine des Glaces’ and ‘Little Gem’. In contrast to *Xcv*, the initial inoculum population of *Bacillus* sp. decreased on all the cultivars, by 1 to more than 2 logCFU g<sup>-1</sup>, without any significant relationship with the resistance groups. The tolerant cultivars exhibited averages of 40 and 57 stomata mm<sup>-2</sup> on the adaxial and abaxial sides of the leaves, respectively; those averages were significantly lower than those of the susceptible cultivars, with 67 and 111 stomata mm<sup>-2</sup>, respectively. However, the stomatal area of the cultivars varied from 110 to 263 µm<sup>2</sup>/stomata and 126 to 232 µm<sup>2</sup>/stomata on the adaxial and abaxial sides of the leaves, respectively. Therefore, no relationship could be established between stomatal area and lettuce cultivar susceptibility. The density of stomata seems to be a good criterion for predicting the degree of tolerance of cultivars, especially when the adaxial side of the leaves is considered.

**Keywords:** disease resistance, *Lactuca sativa*, population dynamics



## 2.3- Introduction

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is susceptible to various diseases caused by fungi, viruses and bacteria. Bacterial leaf spot (BLS) caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* (*Xcv*) is one of the economically important diseases of lettuce (Lu & Raid, 2013; Hayes et al., 2014). The first report of this disease in Quebec, Canada, was in 1994, and a severe outbreak occurred in 1996, causing losses of up to 100% in some lettuce fields (Toussaint, 1999). In most cases, *Xcv* enters lettuce leaves via stomata (Underwood et al., 2007). The first symptoms of BLS generally appear at the leaf margin and consist of water-soaked lesions that become necrotic and confluent later in the season (Carisse et al., 2000). Thus, the symptoms of BLS affect the market value of lettuce, reducing quality and increasing post-harvest losses (Barak et al., 2001). Controlling BLS of lettuce is quite difficult because there are few pesticides registered for treatment (Lu & Raid, 2013). The use of resistant lettuce cultivars remains the most viable strategy for BLS control (Bull & Koike, 2005; Lu & Raid, 2013; Hayes et al., 2014). Lu & Raid (2013) evaluated 69 lettuce germplasm lines for resistance to BLS, and most of them (67) were rated as susceptible to moderately susceptible. Only one resistance gene has been identified in lettuce genomes. The dominant gene *Xar1* (*Xanthomonas* resistance 1) was found on chromosome 2 in the lettuce cultivar ‘La Brillante’ and confers a high level of resistance to specific strains of *Xcv* (Hayes et al., 2014). The cultivar ‘Little Gem’ is also considered to be resistant to a few *Xcv* strains, with a resistance gene that is either allelic or closely linked to *Xar1* (Hayes et al., 2014). Bull et al. (2015) further demonstrated that *Xcv* population growth on lettuce varied among cultivars and was usually higher on susceptible ones. Those authors proposed that a hypersensitive response was responsible for the weak growth rate of *Xcv* on the cultivar ‘Little Gem’ (Bull et al., 2015). Another determinant for the development of bacterial diseases in lettuce is the bacterial community composition of the leaves. Rastogi et al. (2012) established that the presence of some bacterial genera, including *Bacillus*, *Erwinia* and *Pantoea*, was negatively correlated with the presence of *Xcv*. However, few studies have looked at the effect of cultivar on the populations of epiphytic bacteria.

Stomata are present in large numbers on lettuce leaf surfaces and serve as a major route of pathogen entry into plant tissues (Melotto et al., 2006). Both the morphology and structure of

stomata can play a role in host resistance by limiting the penetration of the pathogen (Huang, 1986). Some studies have already referred to this relationship between stomatal density and disease resistance in plants. Ramos & Volin (1987) showed that stomatal frequency on the adaxial and abaxial surfaces of tomato (*Solanum lycopersicum*) leaves was correlated with the number of spot lesions produced after infection with *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Given the weakness of monogenic resistance and the availability of few BLS-resistant genotypes in lettuce, breeding efforts must focus on various alternative resistance factors, including morphoanatomical characteristics.

In light of the role that stomata play in plant–pathogen interactions, the objectives of this study were to: (i) evaluate the resistance to BLS of 10 lettuce cultivars; (ii) determine if BLS severity in lettuce is modulated by the stomatal characteristics of leaves and by the population dynamics of *Xcv* in a genotype-dependent manner; and (iii) assess the population densities of epiphytic *Bacillus* sp. on lettuce leaves in relation to *Xcv*.

## **2.4- Materials and methods**

### **2.4.1- Bacterial strains and inoculum preparation**

Both the rifampicin-resistant *Xcv* strain B07-007 and the streptomycin-resistant *Bacillus* sp. LS2014 were isolated from field-grown lettuce in Montérégie, Quebec, Canada (this study). The isolates were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in a solution of glycerol and nutrient broth (50/50, vol/vol). The bacterial suspensions used for lettuce inoculation were prepared as follows. First, *Xcv* strain B07-007 or *Bacillus* sp. was grown for 72 h at  $28^{\circ}\text{C}$  on yeast extract-dextrose-calcium carbonate agar or on nutrient agar, respectively. Bacteria were then recovered by flooding the plates with saline (NaCl 0.85%), and the inoculum was prepared by adjusting the bacterial concentration using a spectrophotometer, to  $10^8$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ .

### **2.4.2- Plant production**

The morphotype and the identification number of the 10 lettuce cultivars ‘Batavia Reine des glaces’ (BRG), ‘Chief’ (CHI), ‘Estival’ (EST), ‘Gorilla’ (GOR), ‘Hochelaga’ (HOC), ‘Little Gem’ (LIG), ‘Parris Island Cos’ (PIC), ‘Romora’ (ROM), ‘Turbo’ (TUR) and ‘Vista Verde’ (VIV) used in our study are listed in Table 2.1. Lettuce seeds were sowed in seedling trays containing peat moss (Promix; Saint-Remi, Quebec, Canada) as the growth substrate. The trays were placed in a growth chamber for 3 wk at 18°C/16°C (day/night) and 70% relative humidity with a 16-h photoperiod. After emergence, the plants were watered daily and fertilized weekly with a 20-8-20 (N-P-K) soluble fertilizer. When the seedlings were 3 wk old, they were transplanted into 15-cm-diameter plastic pots filled with the same growth substrate and then transferred to a greenhouse and grown under the same conditions as in the growth chamber except for the temperature conditions, which were set at 28°C/14°C (day/night), while relative humidity and photoperiod remained unchanged.

**Table 2.1: Average disease severity index (ADSI) values for 10 lettuce cultivars inoculated with *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*.<sup>1</sup>**

Cultivar	Abbreviation	Type	Plant ID <sup>a</sup>	ADSI (0 to 6) <sup>b</sup>
Chief	CHI	Romaine	PI 635108	5.13 ± 0.69 a
Gorilla	GOR	Romaine	PI 630943	5.16 ± 0.53 a
Parris Island Cos	PIC	Romaine	PI 536817	4.93 ± 0.70 a
Vista Verde	VIV	Crisphead	W6 29938	4.46 ± 0.61 ab
Romora	ROM	Romaine	- <sup>c</sup>	3.66 ± 0.47 bc
Turbo	TUR	Romaine	-	3.52 ± 0.50 bc
Batavia Reine des Glaces	BRG	Batavia	PI 634668	1.83 ± 1.11 d
Hochelaga	HOC	Crisphead	-	2.26 ± 0.99 d
Estival	EST	Great Lakes Crisphead	PI 651883	2.63 ± 1.14 cd
Little Gem	LIG	Vanguard Latin	PI 617959	1.63 ± 0.74 d

<sup>a</sup> Plant ID was assigned according to the US National Plant Germplasm System.

<sup>b</sup> Data are the means of two experiments carried out in five replicates. Data followed by the same letter are not significantly different ( $P < 0.05$ ).

<sup>c</sup> The dash indicates that no plant ID information was available.

<sup>1</sup> Les tableaux et les figures sont numérotés en tenant compte des chapitres respectifs uniquement pour faciliter leur présentation dans la thèse.

#### **2.4.3- Lettuce inoculation**

The *Xanthomonas* or *Bacillus* suspension was applied to 4-wk-old lettuce plants by misting both the adaxial and abaxial leaf surfaces to run-off using a handheld sprayer. The control plants were sprayed with saline only. The plants were then incubated in a greenhouse misting room with a mister set to spray fine water droplets for 30 s every 30 min over a 12-h period for 14 d.

#### **2.4.4- Assessment of susceptibility of lettuce to BLS**

To determine an estimate of disease severity and susceptibility for lettuce cultivars inoculated with *Xcv*, 20 treatments consisting of 10 cultivars inoculated with *Xcv* or uninoculated were arranged as a completely randomized block design. The experiment was carried out in five replicates and was repeated twice. The plants were evaluated for BLS symptoms at 14 d post inoculation (dpi). Disease severity was determined on the most affected leaf of each plant as described in Bull et al. (2015) with some modifications. Ratings were given as follows: 0 for leaves with no symptoms; 1 for leaves with small spots measuring less than 2 mm in diameter; 2 for leaves with distinct lesions measuring 2–5 mm in diameter; 3 for leaves exhibiting coalesced lesions measuring 5–10 mm in diameter; 4 for leaves with coalesced lesions measuring 10–20 mm in diameter; 5 for leaves with coalesced lesions measuring more than 20 mm in diameter; and 6 for dead leaves. A decimal was added to the score to reflect the total area of diseased tissue. No decimal was added if only one-third of the leaf exhibited symptoms. When lesions covered less than half of the leaf surface, 0.33 was added to the score, while 0.66 was added when more than half of the leaf presented symptoms.

#### **2.4.5- Evaluation of population dynamics**

Population dynamics were evaluated on the lettuce plants inoculated with *Bacillus* or infected with *Xcv*. The plants were sampled at five different times: 1 d before infection (T–1), immediately after infection (T0), and at 2, 8 and 14 dpi (T1, T2 and T3, respectively). At each sampling time, four lettuce plants per cultivar were collected at random. Whole plants were

harvested without roots, weighed, and placed individually in polyethylene Stomacher® bags. The plants were then macerated in 100–200 mL of saline, by means of a Stomacher® 400 Circulator machine (Seward Ltd, Bohemia, NY, USA) at 250 rpm for 2 min. Serial dilutions of the macerating solution were plated in duplicate either onto plates of 10% tryptic soy agar supplemented with rifampicin (50 mg L<sup>-1</sup>) and cycloheximide (50 mg L<sup>-1</sup>) for *Xcv* enumeration or onto plates of nutrient agar supplemented with cycloheximide (50 mg L<sup>-1</sup>) for *Bacillus* enumeration. The plates were incubated at 28°C for 3 d before typical colonies of each inoculated strain were counted.

#### **2.4.6- Characterisation of lettuce stomata**

Five-wk-old lettuce plants were used for determination of stomatal characteristics (density and area occupied on the leaves). For five plants of each cultivar, epidermal imprints were made on the second fully expanded leaf. The stomatal imprints were obtained by applying clear nail polish on two-thirds of both the adaxial and abaxial leaf surfaces. After a 5-min drying period, the polymer was peeled off the leaf with pliers and then examined under a Zeiss Imager M1 optical microscope. The stomatal density (number of stomata per unit area) was obtained from microscopy images (five images per cultivar) by counting the stomata on the adaxial and abaxial sides of the leaves, and the stomatal area of each cultivar was determined using the CellProfiler software. CellProfiler is an open-source software that automatically identifies and measures a variety of biological objects in digital images. This software records a full spectrum of measurements for each object, including localization within the image, size, shape, colour, intensity, degree of correlation between colours, texture and number of neighbours (Lamprecht et al., 2007).

#### **2.4.7- Statistical analyses**

Statistical analyses were carried out using the Statistix 9 software. All sets of data requiring statistical analyses were performed with one-way or two-way analysis of variance (ANOVA). Stomatal density, stomatal area and population dynamics (variation of initial inoculum) were

analysed with one-way ANOVA, while disease severity index was analysed using two-way ANOVA with cultivar and repetition as main factors. *A posteriori* comparisons of cultivars were made using least significant difference (LSD) tests.

## 2.5- Results

### 2.5.1- Evaluation of lettuce susceptibility to BLS

The 10 lettuce cultivars were tested for their susceptibility to BLS in two independent trials. The data from both experiments were combined because the variations for severity index in the interactions between cultivars and trials were not significant ( $P = 0.5519$  for repetition and  $P = 0.1645$  for the interaction repetition  $\times$  cultivar). No typical symptoms of BLS were observed on the noninoculated lettuce plants (controls), whereas the inoculated cultivars could be differentiated according to their average disease severity index (ADSI) ( $P < 0.05$ ; [Table 2.1](#)). Figure 2.1 shows representative plants (one plant inoculated with *Xcv* and the other not) for each cultivar.

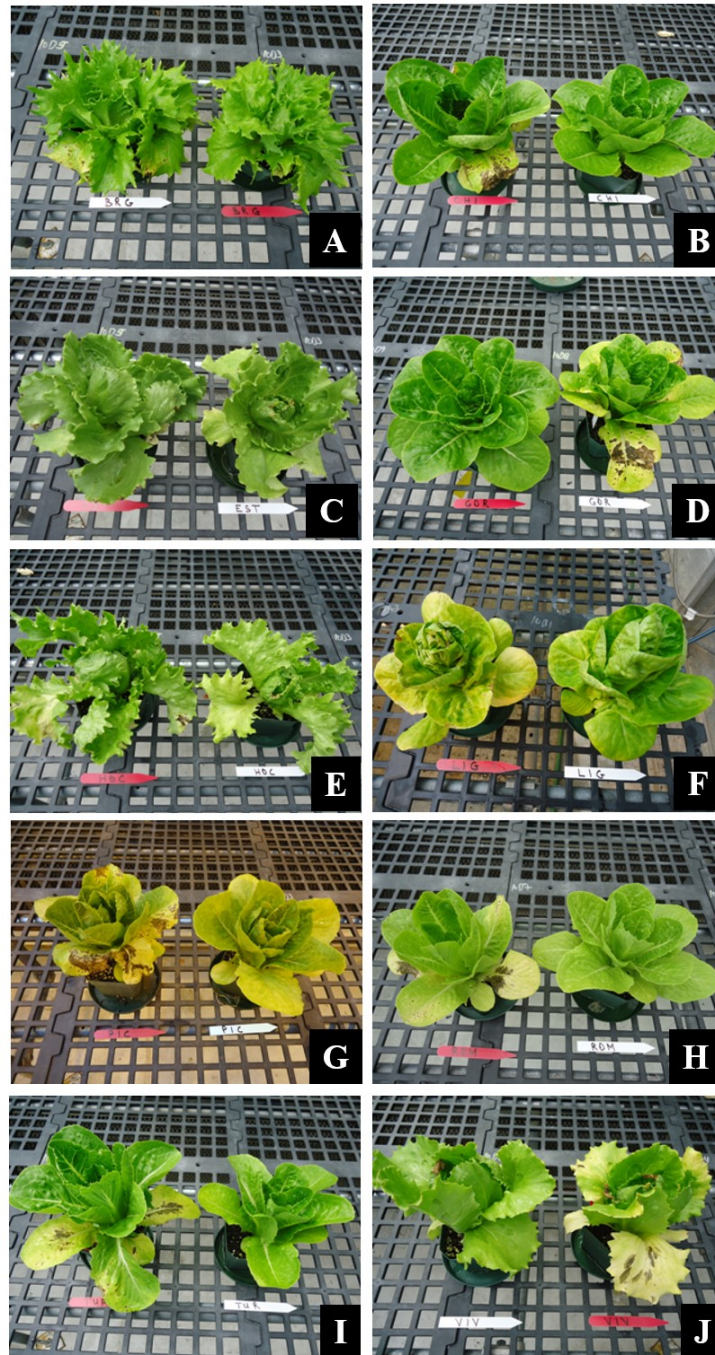
The 10 cultivars infected with *Xcv* strain B07-007 were classified into three groups according to symptom severity ([Table 2.1](#)). The cultivars exhibiting an ADSI below 3.0 were classified as tolerant, and those with an ADSI above 4.0 were classified as susceptible. The cultivars associated with an ADSI between 3.0 and 4.0 were considered to have an intermediate level of susceptibility. However, it was not determined here whether tolerance abilities to BLS shown by cultivars were due to vertical or horizontal resistance (or both). The tolerant group contained the cultivars LIG, BRG, HOC and EST, which had ADSIs ranging from 1.63 to 2.63 ([Table 2.1](#)). The cultivars ROM and TUR were classified in the intermediate group, with ADSIs of 3.52 and 3.66, respectively. Lastly, the susceptible cultivars PIC, GOR, CHI and VIV had ADSIs between 4.46 and 5.16 ([Table 2.1](#)). The most tolerant cultivar was LIG (ADSI of 1.63), whereas GOR was the most susceptible cultivar (ADSI of 5.16). All the romaine morphology-type cultivars belong to the susceptible or intermediary levels of susceptibility groups ([Fig. 2.1](#), [Table 2.1](#)).

### 2.5.2- Characteristics of stomata of lettuce cultivars

Figure 2.2 shows the stomatal density of all 10 lettuce cultivars for both the adaxial and abaxial leaf sides, and Fig. 2.3 provides corresponding micrographs for each leaf side and each cultivar. On the adaxial leaf side, the susceptible group exhibited a higher stomatal density (60 to 71 stomata  $\text{mm}^{-2}$ ) than the tolerant cultivars (32 to 49 stomata/ $\text{mm}^2$ ) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2.2a). The cultivar ROM exhibited a stomatal density similar to that of the tolerant cultivars LIG and EST (44, 49 and 49 stomata  $\text{mm}^{-2}$ , respectively), whereas stomatal density did not vary significantly between the other intermediate cultivar TUR and the susceptible cultivars GOR, PIC and VIV (68 to 74 stomata  $\text{mm}^{-2}$ ). The tolerant cultivars HOC and BRG exhibited the lowest stomatal density (33 and 34 stomata  $\text{mm}^{-2}$ , respectively).

Stomatal density was higher on the abaxial leaf side than on the adaxial leaf side for all cultivars. The stomatal density on the abaxial side of the leaves varied from 69 to 143 stomata  $\text{mm}^{-2}$  for the susceptible cultivars and from 49 to 62 stomata  $\text{mm}^{-2}$  for the tolerant cultivars. All the susceptible cultivars except VIV also exhibited abaxial stomatal densities that were higher than those of the tolerant cultivars (Fig. 2.2b). The intermediate cultivars ROM and TUR exhibited abaxial stomatal densities of 67 and 69 stomata  $\text{mm}^{-2}$ , respectively. The stomatal area on lettuce leaves varied between 160 and 263  $\mu\text{m}^2$  stomata $^{-1}$  and between 126 and 232  $\mu\text{m}^2$  stomata $^{-1}$  on the adaxial and abaxial sides, respectively (Fig. 2.2). No relationship could be established between stomatal area and lettuce cultivar susceptibility to *Xcv*.

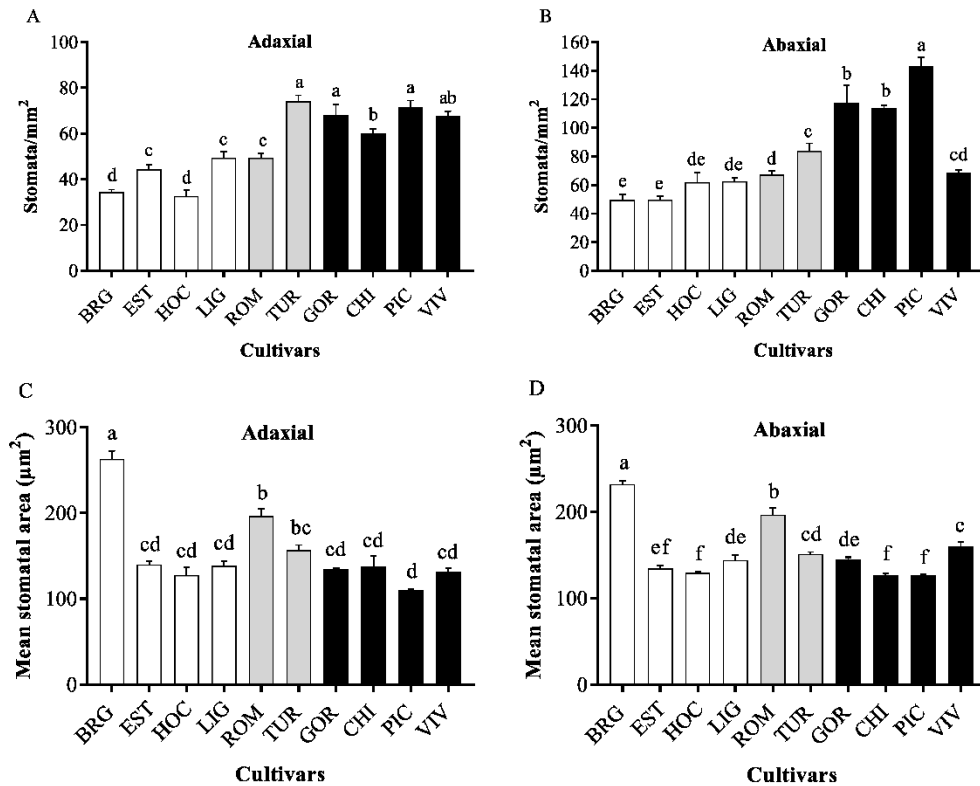




**Figure 2.1:** Photographs of the 10 lettuce cultivars infected with *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* and their corresponding controls sprayed with saline. The photographs were taken 7 d post inoculation. The cultivars used were as follows: BRG, ‘Batavia Reine’ des glaces (a); CHI, ‘Chief’ (b); EST, ‘Estival’ (c); GOR, ‘Gorilla’ (d); HOC, ‘Hochelaga’ (e); LIG,



‘Little Gem’ (f); PIC, ‘Parris Island’ Cos (g); ROM, ‘Romora’ (h); TUR, ‘Turbo’ (i); VIV, ‘Vista Verde’ (j). Red tags are shown in front of the experimental plants sprayed with *Xcv* and white tags are shown in front of the controls sprayed with saline only.



**Figure 2.2: Stomatal density (a, b) and stomatal area (c, d) on the adaxial (a, c) and the abaxial (b, d) leaf sides of 10 lettuce cultivars (cultivars abbreviations are as in Fig. 1) with different levels of resistance to bacterial leaf spot.** Values are the mean (+ S.D.) of five plants (one leaf per plant). Values with the same letters are not significantly different (LSD test,  $P < 0.05$ ). The white, grey, and black bars indicate tolerant, intermediate, and susceptible cultivars, respectively.

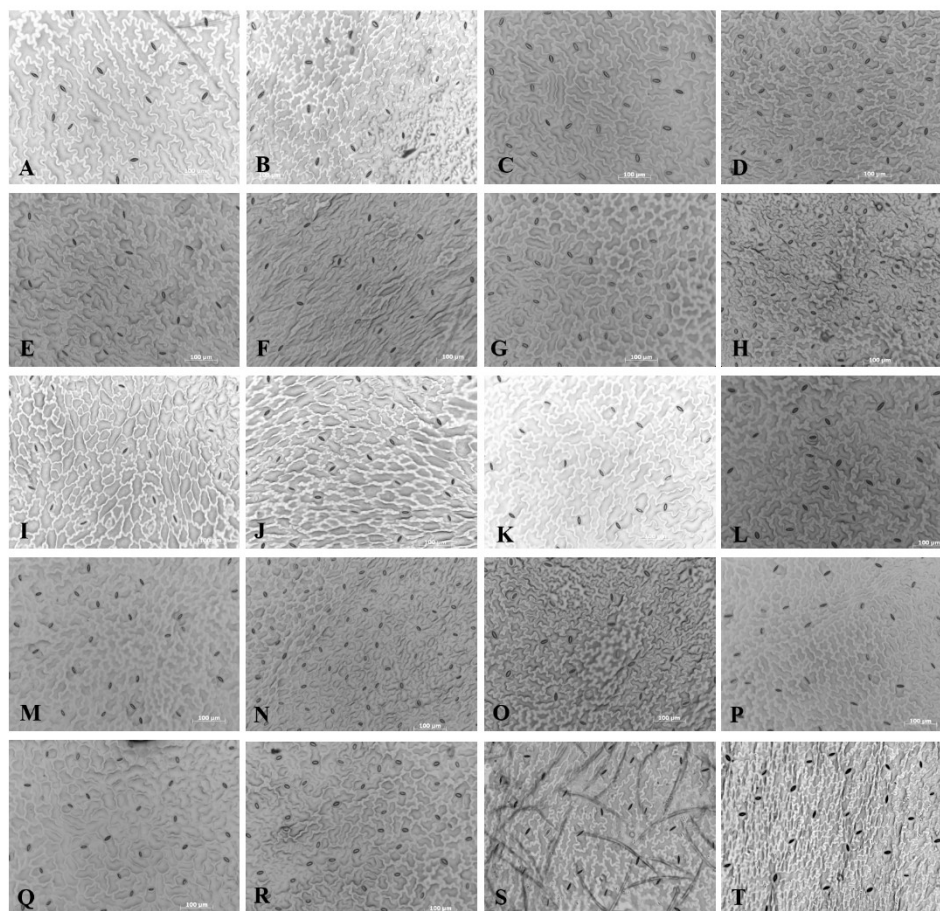
### 2.5.3- Population dynamics of *Xcv* on lettuce cultivars

The existence of a relationship between the resistance level of the 10 lettuce cultivars and the population dynamics of *Xcv* and *Bacillus* sp. was tested over a 14-d period. For all the lettuce cultivars, the initial *Xcv* inoculum population had not changed considerably by 2 dpi. The population then exhibited significant growth on all cultivars except the tolerant cultivars *LIG* and *BRG* (Supplemental Fig. 2.1). The *Xcv* population of *LIG* and *BRG* increased only slightly (by less than 1 logCFU g<sup>-1</sup>) from 0 to 14 dpi, whereas the *Xcv* population of all the other cultivars showed at least a 2-fold increase (Fig. 2.4a). In contrast to *Xcv*, the epiphytic *Bacillus* sp. did not appear to multiply on lettuce leaves, given that the initial inoculum population decreased, 14 days after inoculation, by 1–2 logCFU g<sup>-1</sup> for *BRG*, *EST*, *HOC*, *LIG*, *CHI*, *GOR*, *CHI* and *VIV* and by more than 2 logCFU g<sup>-1</sup> for *ROM* and *TUR* (Fig. 2.4b).

## 2.6- Discussion

The cultivars used in our study showed differential levels of resistance to BLS. The most susceptible lettuce cultivars to BLS were romaine type, supporting the observations of Wang et al. (2015) who demonstrated that romaine lettuce cultivars were generally more susceptible to virulent *Xcv* isolates. Romaine cultivars have a different morphology with better exposed leaves than other lettuce types have (Fig. 2.1), which may explain their greater susceptibility to BLS. This susceptibility may also be explained by the fact that these cultivars have seldom been used in genetic crosses and lack gene exchanges with other lettuce types, as previously proposed by Lu et al. (2014). Among the 10 evaluated cultivars, *LIG* and *BGR* were the most tolerant ones. Bull et al. (2007) also reported that these cultivars were among the most resistant ones under both field and greenhouse conditions. According to Hayes et al. (2014), the tolerance of *LIG* to *Xcv* could be explained by the presence in its genome of resistance genes that are either allelic or closely linked to *XarI*, a single dominant gene conferring a high level of resistance to *Xcv*. The inoculation of *Xcv* on *LIG* resulted in very small leaf spots that could effectively represent a hypersensitive reaction (Bull et al., 2015). Identifying other pre-existing structural and chemical defence factors that may be incorporated into a lettuce breeding programme against

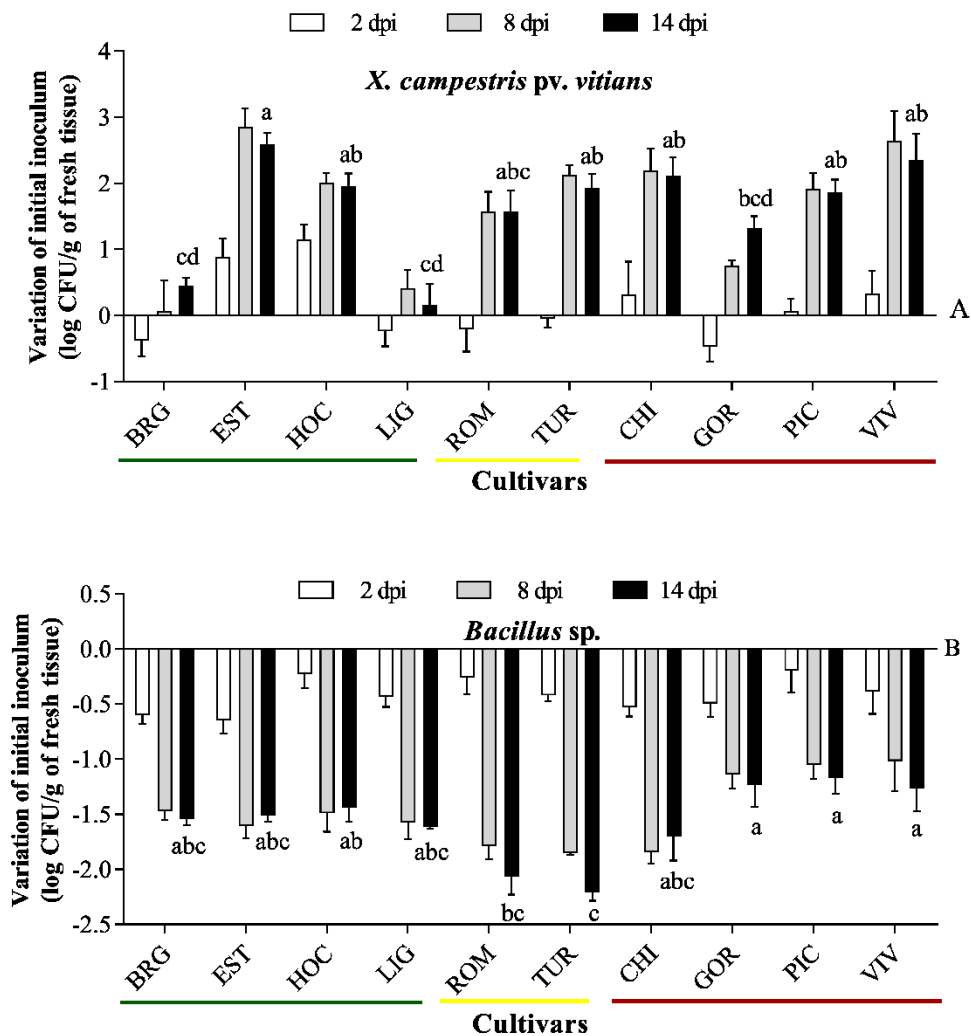
BLS should be considered in the future. Although included in the tolerant cultivars group, BRG, HOC and EST have not been reported to contain the resistance gene *Xar1* or other resistance genes in their genomes; however, the presence of such genes cannot be excluded, especially for BRG, which only weakly supported *Xcv* growth. In our study, the initial population of *Xcv* increased only slightly over a 14-d incubation period when *Xcv* was inoculated onto the leaf surfaces of the tolerant cultivars BRG and LIG.



**Figure 2.3: Stomatal micrographs of 10 lettuce cultivars (20× magnification).** Each pair of micrographs shows the adaxial (left) and the abaxial (right) sides of the same leaf for one cultivar. The cultivars used were as follows: ‘Batavia Reine des glaces’ (a, b), ‘Chief’ (c, d), ‘Estival’ (e, f), ‘Gorilla’ (g, h), ‘Hochelaga’ (i, j), ‘Little Gem’ (k, l), ‘Parris Island Cos’ (m, n), ‘Romora’ (o, p), ‘Turbo’ (q, r) and ‘Vista Verde’ (s, t).

This trend toward lower pathogen populations was also described by Barton-Willis et al. (1989) with respect to the growth dynamics of *X. campestris* pv. *oryzae* on leaves of rice cultivars, where the populations of bacteria were always 1 or 2 log units lower in the incompatible interaction than in the compatible interaction. Similar results were obtained by Willis & Kinscherf (2009) in their study of the population dynamics of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato, where the mean population sizes were 4–5 orders of magnitude larger on the susceptible tomato line than on the resistant line containing the Pto gene. While BRG and LIG had relatively low *Xcv* populations, EST and HOC, also considered tolerant cultivars, had considerable increases in *Xcv* populations after inoculation. Therefore, the multiplication of the initial pathogen inoculum when the bacterium was sprayed on a given cultivar does not always seem to correlate with the extent of the resulting symptoms (Bull et al., 2015; Al-Saleh et al., 2011). Some structural aspects of lettuce leaves, such as presence of wax, cutin, lenticels, and the structure of the epidermal cell, may affect the resistance of cultivars to BLS and need to be investigated in further studies. The present work supports previous observations that the host affects the epiphytic growth of *Xcv* (Bull et al., 2015; Al-Saleh et al., 2011; Fayette et al., 2018).

The presence of *Xcv* on lettuce was shown to be negatively correlated with the presence of several bacterial genera, including *Bacillus* (Rastogi et al., 2012). However, unlike *Xcv*, the initial inoculum population of *Bacillus* sp. decreased independently of the cultivar tested in the present study. Species of *Bacillus* are frequently used in biocontrol studies of plant pathogens because of the diversity of modes of action, which include competition, antibiotic production and induction of systemic resistance (Monteiro et al., 2005). However, the response of lettuce cultivars to *Xcv* did not appear to depend on the capacity to support growth of epiphytic bacteria such as *Bacillus*.



**Figure 2.4: Variation in the initial inoculum populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* strain B07-007 (A) and *Bacillus* sp. (B) on 10 lettuce cultivars** (see caption of Fig. 2.1 for cultivars abbreviations). Four-wk-old *Lactuca sativa* plants were inoculated with  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>. Bacterial populations were sampled four times over a period of 14 d post inoculation (dpi). The white, grey, and black bars indicate 2, 8, and 14 dpi, respectively. The green, yellow, and red lines indicate tolerant, intermediate, and susceptible cultivars, respectively. Multiple comparison LSD test was performed on 14 dpi values; black bar values accompanied by the same letter are not significantly different ( $P < 0.05$ ).

Stomata represent one of the most important routes for the entry of bacterial pathogens into plants (Melotto et al., 2008), including *Xcv* (Underwood et al., 2007). Considering the roles played by stomata in plant infection by several plant pathogens (Montillet & Hirt, 2013), particularly *Xanthomonas* (Ryan et al., 2011), it is possible that lettuce cultivars with higher stomatal densities could be more susceptible to BLS. Our results suggest that stomatal density may influence the resistance of lettuce to BLS. Ramos & Volin (1987) previously showed that stomatal numbers on the adaxial and abaxial leaf surfaces of tomato were correlated with the number of spot lesions produced after infection with *X. campestris* pv. *vesicatoria*. In our study, all the susceptible cultivars (VIV, CHI, GOR and PIC) had higher adaxial stomatal densities than the resistant cultivars, although the same was not always the case for the abaxial side of the leaves. Our results also show that lettuce stomatal density was generally higher on the abaxial side of the leaves than on the adaxial side. This is generally the case in most plant species (Weryszko-Chmielewska & Michałojć, 2009). However, no relationship could be established between stomatal area and lettuce cultivar susceptibility to *Xcv*. Considering that *Xanthomonas* cells measure 0.2–0.6  $\mu\text{m}$  by 0.8–2.9  $\mu\text{m}$  (Swings & Civerolo, 1993) and that the stomatal area on lettuce leaves varied from 110 to 263  $\mu\text{m}^2\text{stomata}^{-1}$ , the stomatal area does not appear as a limiting factor to bacterial penetration. Stomatal density thus emerges as a more important parameter than stomatal area in terms of the susceptibility of cultivars to BLS. In addition to stomatal density, reducing the stomatal aperture size following bacterial infection may be important in resistance, as it has been shown that a susceptible tomato accession had a greater stomatal aperture over a longer duration after *Xanthomonas perforans* infection than two resistant tomato accessions (Wang et al., 2017).

Our study suggests that lettuce cultivars have different degrees of resistance to BLS. In particular, the tolerant cultivars BRG and LIG did not exhibit any changes in the size of the *Xcv* populations over a period of 14 d, whereas the populations of *Bacillus* sp. decreased in all cultivars without significant differences among the three susceptibility groups.

Stomatal density on the adaxial side of the leaves is a relevant characteristic for predicting cultivar susceptibility to BLS. Nevertheless, there are many factors that could determine the basis of the tolerance of particular lettuce cultivars to BLS. For example, Yean et al. (2009) showed that lettucenin A is a major phytoalexin produced in lettuce. Further studies

on these cultivars are under way to identify factors such as mineral composition of the lettuce cultivars or lettuce proteomes correlating with lettuce tolerance to BLS.

## 2.7- Acknowledgements

We thank Daniel Garneau, Sylvain Lerat, Mélanie Cadieux, and Marie Ciotola for their technical assistance and Gina Chaput and Mary Varcoe for their critical review of the manuscript.

## 2.8- Funding

This work was supported by a grant from the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ).

## 2.9- Supplemental material

Supplementary data can be accessed online here:

<https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1495269>

## 2.10- References

- Al-Saleh MA, Ibrahim YE, Abo-Elyousr KAM, Alibrahim JS. 2011. Population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* on different plant species and management of bacterial leaf spot of lettuce under greenhouse conditions. *Crop Prot.* 30:883–887.
- Barak JD, Koike ST, Gilbertson RL. 2001. Role of crop debris and weeds in the epidemiology of bacterial leaf spot of lettuce in California. *Plant Dis.* 85:169–178.
- Barton-Willis PA, Roberts PD, Guo A, Leach JE. 1989. Growth dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* in leaves of rice differential cultivars. *Phytopathology.* 79:573–578.
- Bull CT, Gebben SJ, Goldman PH, Trent M, Hayes RJ. 2015. Host genotype and hypersensitive reaction influence population levels of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in lettuce. *Phytopathology.* 105:316–324.

Bull CT, Goldman PH, Hayes R, Madden LV, Koike ST, Ryder E. 2007. Genetic diversity of lettuce for resistance to bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. Plant Health Prog. doi:10.1094/PHP-2007-0917-02-RS.

Bull CT, Koike ST. 2005. Evaluating the efficacy of commercial products for management of bacterial leaf spot on lettuce. Plant Health Prog. doi:10.1094/PHP-2005-1121-01-RS.

Carisse O, Ouimet A, Toussaint V, Phillion V. 2000. Evaluation of the effect of seed treatments, bactericides, and cultivars on bacterial leaf spot of lettuce caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. Plant Dis. 84:295–299.

Fayette J, Jones JB, Pernezny K, Roberts PD, Raid R. 2018. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* on lettuce in crop debris, irrigation water, and weeds in south Florida. Eur J Plant Pathol. 151:341–353.

Hayes RJ, Trent MA, Truco MJ, Antonise R, Michelmores RW, Bull CT. 2014. The inheritance of resistance to bacterial leaf spot of lettuce caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in three lettuce cultivars. Hort Res. 1:14066.

Huang J. 1986. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. Annu Rev Phytopathol. 24:141–157.

Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE. 2007. CellProfiler™: free, versatile software for automated biological image analysis. BioTechniques. 42:71–75.

Lu H, Hu J, Kwon SJ. 2014. Association analysis of bacterial leaf spot resistance and SNP markers derived from expressed sequence tags (ESTs) in lettuce (*Lactuca sativa* L.). Mol Breed. 34:997–1006.

Lu H, Raid R. 2013. A novel screening method for evaluation of lettuce germplasm for bacterial leaf spot resistance. HortScience. 48:171–174.

Melotto M, Underwood W, He SY. 2008. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. Annu Rev Phytopathol. 46:101–122.

Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY. 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. Cell. 126:969–980.

Monteiro L, Mariano RDLR, Souto-Maior AM. 2005. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Braz Arch Biol Technol. 48:23–29.

Montillet J-L, Hirt H. 2013. New checkpoints in stomatal defense. Trends Plant Sci. 18:295–297.



- Ramos LJ, Volin RB. 1987. Role of stomatal opening and frequency on infection of *Lycopersicon* spp. by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*. 77:1311–1317.
- Rastogi G, Sbodio A, Tech JJ, Suslow TV, Coaker GL, Leveau JHL. 2012. Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *ISME J*. 6:1812–1822.
- Ryan RP, Vorhölter F-J, Potnis N, Jones JB, Van Sluys M-A, Bogdanove AJ, Dow JM. 2011. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. *Nat Rev Microbiol*. 9:344–355.
- Swings JG, Civerolo EL. 1993. *Xanthomonas*. London: Chapman and Hall.
- Toussaint V. 1999. Bacterial leaf spot, a new disease of lettuce in Quebec caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Phytoprotection*. 80:121–125.
- Underwood W, Melotto M, He SY. 2007. Role of plant stomata in bacterial invasion. *Cell Microbiol*. 9:1621–1629.
- Wang Y, Lu H, Raid RN, Nuessly GS, Faroutine G. 2015. Diverse responses of lettuce cultivars and germplasm lines to infections of three isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *HortScience*. 50:650–655.
- Wang YQ, Zhang XF, Li N, Liu X. 2017. Comparison of cellular responses to *Xanthomonas perforans* infection between resistant and susceptible tomato accessions. *J Plant Physiol*. 209:105–114.
- Weryszko-Chmielewska E, Michałojć Z. 2009. Anatomical features of leaves of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) fed with calcium using foliar nutrition. *Acta Agrobot*. 62:155–164.
- Willis DK, Kinscherf TG. 2009. Population dynamics of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* strains on tomato cultivars Rio Grande and Rio Grande-Pto under field conditions. *J Phytopathol*. 157:219–227.
- Yean HC, Atong M, Chong KP. 2009. Lettucenin A and its role against *Xanthomonas campestris*. *J Agric Sci*. 1:87.

## CHAPITRE 3

### L'ionome de la laitue infectée par *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*

#### 3.1- Introduction de l'article et contributions des auteurs

La tache TBL causée par *Xcv* est l'une des contraintes majeures à la production de la laitue à travers le monde. La stratégie de contrôle la plus viable connue jusqu'à présent est l'utilisation de cultivars résistants. L'ionome de dix cultivars de laitue présentant 3 niveaux de résistance à la TBL a été analysé par spectroscopie d'émission optique par plasma à couplage inductif (ICP-OES) en vue d'établir les relations entre balances nutritionnelles et résistance à la TBL ainsi que l'effet de l'inoculation avec *Xcv* sur l'ionome. Les concentrations élémentaires ont été prétraitées avec les log-ratios isométriques en vue de définir les balances. L'utilisation de cette approche a révélé que les balances univariées [Fv | Fe,Mn,Zn, Cu,Mg,Ca,Na,K,S,N,P], [Mn | Zn,Cu], [Zn | Cu] and [S,N | P] affectaient significativement la résistance des cultivars de laitue à la TBL ( $p < 0.05$ ). De plus, l'inoculation des laitues avec *Xcv* a affecté significativement son ionome avec un effet plus marqué au niveau de la balance [N,S | P] avec l'inoculation tendant à faire pencher cette balance vers la partie N,S par rapport à P. Cette étude montre que l'accumulation des éléments nutritifs chez la laitue peut être affectée par l'infection et que la composition ionomique de la plante affecte sa résistance à la tache bactérienne.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'un autre article scientifique intitulé : « The ionomics of lettuce infected by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* », référence : Front Plant Sci. 2019; 10: 351. doi: 10.3389/fpls.2019.00351. Cet article a été publié dans « Frontiers in Plant Sciences » le 22 mars 2019, dans la section « Plant Nutrition ». La référence de cet article est : Les expériences sur la composition ionomique des cultivars ont été réalisées par Olbert Nicolas et les analyses chimiques réalisées au laboratoire de chimie du Centre de Recherche et de Développement de Saint-Jean-sur-Richelieu.

Les analyses statistiques ont été effectuées sous la direction de Serge Étienne Parent de l'Université de Laval. Vicky Toussaint a agi comme conseillère au montage de l'expérience et à la mise en place des méthodes expérimentales. Sylvie Jenni a contribué l'élaboration du projet de recherche et à la révision du manuscrit. Marie Thérèse Charles a contribué à la planification des essais et à la révision critique du manuscrit. Finalement Carole Beaulieu a agi comme Directrice de recherche, conseillère à la planification des travaux et superviseure dans la rédaction de ce manuscrit.

**The ionomics of lettuce infected by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians***

**Olbert Nicolas<sup>1,2</sup>, Marie Thérèse Charles<sup>2</sup>, Sylvie Jenni<sup>2</sup>, Vicky Toussaint<sup>2</sup>, Serge-Étienne Parent<sup>3</sup>, and Carole Beaulieu<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Department de biologie, Université de Sherbrooke, 2500 boul. de l'université, Sherbrooke, QC, J1K 2R1, Canada

<sup>2</sup>Agriculture and Agri-Food Canada, Saint-Jean-sur-Richelieu Research and Development Centre, 430 boul. Gouin, Saint-Jean-sur-Richelieu, QC, J3B 3E6, Canada

<sup>3</sup>Department of Soils and Agri-Food Engineering, Université Laval, 2325 rue de l'Université, Québec, QC, G1V 0A6, Canada.

**\*Correspondence:**

Dr. Carole Beaulieu

[Carole.Beaulieu@USherbrooke.ca](mailto:Carole.Beaulieu@USherbrooke.ca)

Front. Plant Sci. 10:351. doi: 10.3389/fpls.2019.00351

### 3.2- Abstract

Bacterial leaf spot (BLS) caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* (*Xcv*) places a major constraint on lettuce production worldwide. The most sustainable strategy known to date for controlling BLS is the use of resistant cultivars. The nutrient elemental signature (ionome) of ten lettuce cultivars with three levels of resistance was analyzed by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) to determine which nutrient balances are linked to resistance to BLS, and to assess the effect of *Xcv* infection on the ionome. The elemental concentrations were preprocessed with isometric log-ratios to define nutrient balances. Using this approach, 4 out of 11 univariate nutrient balances were found to significantly influence the resistance of lettuce cultivars to BLS ( $P < 0.05$ ). These significant balances were the overall nutritional status balancing all measured nutrients with their complementary in the dry mass, as well as balances [Mn | Zn,Cu], [Zn | Cu] and [S,N | P]. Moreover, the infection of lettuce cultivars mostly affected the lettuce ionome on the [N,S | P] balance, where infection tended to lean the balance toward the N,S part relatively to P. This study shows that nutrient uptake in lettuce can be affected by BLS infection and that nutrient status influences resistance to BLS infection.

**Keywords:** bacterial leaf spot, ICP-OES, ionomics, *Lactuca sativa*, lettuce, nutrient balance, plant resistance, *Xanthomonas campestris*

### 3.3- Introduction

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is one of the most popular vegetables worldwide. It is mostly cultivated in temperate and subtropical climates. With seven main groups of cultivars, lettuce is morphologically the most diverse species of the genus *Lactuca* as distinguished by phenotypic characteristics: crisphead, cos (romaine), butterhead, leaf, latin, stem and oilseed (De Vries, 1997).

According to Lebeda et al. (2007), several diseases of lettuce have been described, but only a few are important enough to be considered in crop protection. Among these diseases, bacterial leaf spot (BLS) of lettuce caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* (*Xcv*) is economically important worldwide (Lu and Raid, 2013). BLS infection of lettuce is favored by warm and humid climatic conditions (Wang et al., 2015). Typical symptoms are black, water-soaked lesions on the leaves (Hayes et al., 2014), which may coalesce under conditions favorable to *Xcv* development, causing large necrotic spots on the leaves (Toussaint, 1999). The unsightly leaf blemishes render lettuce unmarketable (Robinson et al., 2006).

The current phytosanitary products used to control BLS have to date shown poor efficiency (Lu and Raid, 2013). Common control strategies such as prophylactic measures, specifically removal of crop debris and use of clean farm machinery, are often ineffective because occurrence of this disease is sporadic (Bull et al., 2015). Nevertheless, the most widely accepted strategy for controlling BLS of lettuce is the use of resistant cultivars (Bull and Koike, 2005). Therefore, sustainable management of disease resistance requires sound knowledge of factors that may contribute to this resistance. Different levels of resistance to BLS have been reported in lettuce, and the single dominant *Xanthomonas* resistance gene 1 (*Xar1*) has been identified as being responsible for resistance in some lettuce cultivars (Hayes et al., 2014). Other factors such as stomatal density of the leaves have been also reported to play a role in lettuce resistance (Nicolas et al., 2018).

Mineral elements play an important nutritional role in plants. Seventeen macronutrients (including C, H, O, N, S, P, Ca, K and Mg) and micronutrients or trace nutrients (including Ni, Mo, Cu, Zn, Mn, B, Fe, and Cl) are known to be essential to all plants (Williams and Salt, 2009). Nutrients can affect the development of a disease by affecting plant physiology, the causal pathogen, or both (Dordas, 2009). Micronutrients are involved in diverse cellular functions, including energy metabolism, primary and secondary metabolism, defense, gene regulation, hormone perception, signal transduction and reproduction (Hänsch and Mendel, 2009). High metal levels can restrict host colonization by microbial pathogens and be utilized as a defense mechanism by the host during plant-microbe interactions (Navarrete and De La Fuente, 2015).

The ionome, i.e. the “mineral nutrient and trace elements found in an organism” (Lahner et al., 2003), has been studied in many fields of biology, namely in agronomy (Jaradat and Goldstein, 2018), physiology (Baxter et al., 2008), ecology (Aerts and Chapin, 2000) and functional genetics (White and Brown, 2010). Lettuce contains several macro elements (e.g. Ca, Mg, Na, K) and trace elements (e.g. Fe, Mn, Zn, Cu) (Pinto et al., 2014). Several of these elements, by virtue of their biological functions, affect pathogenic interactions between bacteria and plants. Some are involved in biologic functions of the cell such as enzyme activation, regulation of gene expression, hormone synthesis and perception (DalCorso et al., 2014). The concentrations of transition metals in the environment and the availability of essential metals to support pathogen growth can have a significant impact on the outcome of plant-pathogen interactions (Fones and Preston, 2013).

Ionomes belong to the class of compositional data, i.e. data representing parts of a whole (Aitchison, 1986). The isometric log ratio (ilr) transformation overcomes inherent biases emerging from statistical analyses of compositional data by transforming components to non-overlapping orthonormal ratios of components (Egozcue et al., 2003). The ilr transformation is suitable for conducting multivariate analyses of ionomes, because it can illustrate the nutrient relationships as a multidimensionnal map of sound, hierarchically arranged binary balances between groups of nutrients (Parent et al., 2013, Modesto et al., 2014). Nutrient balances can also be included in non-linear models to achieve greater accuracy (Silverman et al., 2017).

Considering that uptake and translocation of mineral elements in plants is influenced by plant species (Pinto et al., 2014), the objective of this study was to determine the following: i) a possible relationship between the ionome and cultivar resistance and ii) the effect of BLS infection on the ionome.

This study provides seminal information that could be used not only to develop a suitable fertilization strategy for the management of BLS in lettuce but also to improve understanding of the role played by nutrient balances in plant-pathogen interactions.

### **3.4- Materials and methods**

#### **3.4.1- Plant production**

The lettuce cultivars used in this study were previously characterized for their resistance to BLS by Nicolas et al. (2018) (**Table 3.1**), according to a modified version of the method developed by Bull et al. (2015). Cultivars were classified into three groups based on their susceptibility to BLS: tolerant group with Batavia Reine des Glaces (BRG), Little Gem (LIG), Estival (EST) and Hochelaga (HOC); intermediate group with Romora (ROM) and Turbo (TUR); and susceptible group with Chief (CHI), Gorilla (GOR), Paris Island Cos (PIC) and Vista Verde (VIV). These cultivars are representative lettuce types from the Agriculture and Agri-Food Canada lettuce breeding program (Nicolas et al., 2018).

Lettuce seeds were sown in seedling trays containing peat moss (Promix, Saint-Remi, QC, Canada) as growth substrate. The seedlings were placed in a growth chamber with the following conditions: temperature of 18°C (day) and 16°C (night), with 70% relative humidity and a 16-h photoperiod. After 21 days, the seedlings were transplanted into 15-cm-diameter pots, filled with the same growth substrate. Experimental units of lettuce were grown in a greenhouse with temperatures ranging from 14 to 28°C, 70% relative humidity and 16-h photoperiod. Plants were fertilized every week with a 20-8-20 (N-P-K) soluble fertilizer.



**Table 3.1: Susceptibility of the ten lettuce cultivars used in this study when inoculated with *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* (after Nicolas et al., 2018).**

Cultivar	Type	Plant ID <sup>a</sup>	Resistance to BLS
Chief	Romaine	PI635108	Susceptible
Gorilla	Romaine	PI630943	Susceptible
Paris Island Cos	Romaine	PI536817	Susceptible
Vista Verde	Romaine	W629938	Susceptible
Romora	Romaine	- <sup>b</sup>	Intermediate
Turbo	Romaine	-	Intermediate
Batavia R.G.	Batavia	PI634668	Tolerant
Hochelaga	Crisphead Great Lakes	-	Tolerant
Estival	Crisphead Vanguard	PI651883	Tolerant
Little Gem	Latin	PI617959	Tolerant

<sup>a</sup>Plant ID is based on the US National Plant Germplasm system.

<sup>b</sup>Information not available

### 3.4.2- Lettuce inoculation

One week after transplantation, lettuce plants were infected with the rifampicin-resistant *X. campestris* pv. *vitians* strain B07-007, isolated from field-grown lettuce in the Montérégie region (QC, Canada). The bacterium was conserved at  $-80^{\circ}\text{C}$  in a solution of glycerol and nutrient broth (50:50 vol:vol) and grown at  $28^{\circ}\text{C}$  in yeast extract-dextrose carbonate (YDC) agar for 72 h. Bacteria from the incubation plates were scraped off and suspended in saline buffer ( $8.5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$ ). The culture was diluted to a final concentration of  $10^8$  colony-forming units (cfu) per ml ( $\text{OD}_{600} = 0.1$ ) in saline buffer. Using an airbrush, the bacterial suspension was sprayed onto 28-day-old lettuces so that it would run off the abaxial and adaxial sides of the plant leaves. Control plants were sprayed with saline buffer ( $8.5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$ ) only, and all plants were incubated in a greenhouse misting room with a mist set to spray fine water droplets for 30 s every 30 min for 12 h (6:00 AM to 6:00 PM) over 14 days. A total of 240 lettuces divided into

10 cultivars, 2 treatments and 4 replicates were distributed in a randomized complete block design. The experiment was repeated three times independently.

### 3.4.3- Ionome characterization

The characterization was performed on 6-week-old lettuces. Fourteen days after infection, the whole plants, excluding the roots, were sampled. For each sample, three lettuces were placed in the same paper bag and dried at 70°C for 72 h. The dried plants were crushed into a fine powder, and a 5-g portion was used for further analysis. A total of 40 uninfected and 40 infected samples were prepared and used in the analyses. After digestion (Havlin and Soltampson, 1980) of 1 g of dry sample with nitric acid, the analysis was performed for Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S and Zn by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) using a Perkin Elmer Optima 3200DVom. The determination of total N in the lettuce tissues was performed following the method proposed by Issac and Jonson (1976).

### 3.4.4- Statistical analysis

The leaf ionome was preprocessed by transforming nutrient concentrations to balances of nutrients with the ilr technique. Isometric log ratios are computed as:

$$ilr_i = \sqrt{\frac{n_i^+ n_i^-}{n_i^+ + n_i^-}} \ln \left( \frac{g(c_i^+)}{g(c_i^-)} \right)$$

where, in the  $i^{th}$  row of the SBP,  $n_i^+$  and  $n_i^-$  are the numbers of components in the numerator group and the denominator group, respectively,  $g(c_i^+)$  is the geometric mean of components in the numerator group and  $g(c_i^-)$  is the geometric mean of components in the denominator group. Balances are noted  $[A,B | C,D]$ , where components A and B at the denominator are balanced with components C and D at the numerator. A positive balance means that the geometric mean of concentrations of components C and D is larger than the geometric mean of concentrations of components A and B, conversely for a negative balance and even for a null balance. Hence,

in linear modeling, a positive effect on  $[A,B | C,D]$  means that the increase of the importance of C and D compared to A and B is associated with an increase of the response variable of the model.

The selected balance design for this study is presented in **Figure 3.1**. The filling value, Fv, is the amalgamation of all elements excluded from the analysis (mainly carbon, oxygen and hydrogen), computed by difference between the unit or scale of measurement and the sum of included elements.

Computations were performed in the R statistical language version 3.4.1 (R Core Development Team, 2017). The main packages used in the data analysis workflow were the vegan package version 2.4-3 (Oksanen et al., 2017) for ordination, the compositions package version 1.40-1 (van den Boogaart and Tolosana-Delgado, 2013) for ilr transformations, the nlme version 3.1-131 (Pinheiro et al., 2017) package to compute the random experimental effect, the mvoutlier package version 2.0.8 (Filzmoser and Gschwandtner, 2017) for multivariate outlier detection, and the ggplot2 package version 2.2.1 (Wickham and Chang, 2017) for data visualization. The data and computations are publicly available at [https://github.com/essicolo/Nicolas-et-al\\_Infected-lettuce-ionomics](https://github.com/essicolo/Nicolas-et-al_Infected-lettuce-ionomics).

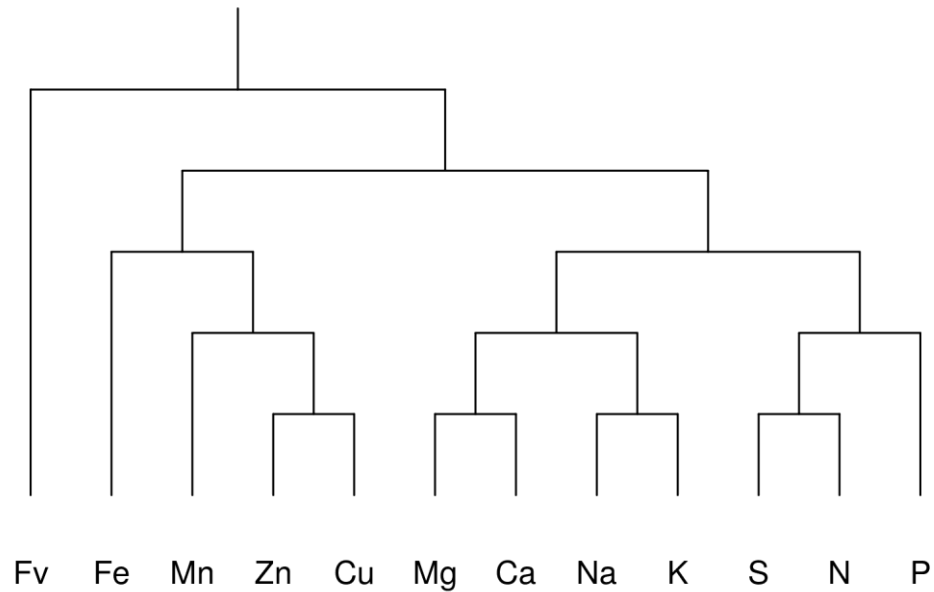
### 3.5- Results

#### 3.5.1- Data preprocessing

Fourteen days post inoculation, symptoms were observed on the lettuce leaves according to their degree of resistance to BLS as described in Nicolas et al. (2018).

Data exploration revealed a large experimental effect on the ionome, as shown in the density curves in **Figure 3.2**. A discriminant analysis (not shown) confirmed the density discrepancies. The second experiment stands apart from the first and third experiments mainly due to the  $[Mn | Zn,Cu]$  balance, the  $[Zn | Cu]$  balance and the  $[Fv | nutrients]$  balance. The three experiments differ mainly in terms of the  $[N,S | P]$  balance, the  $[Mg,Ca | Na,K]$  balance and the  $[Zn | Cu]$

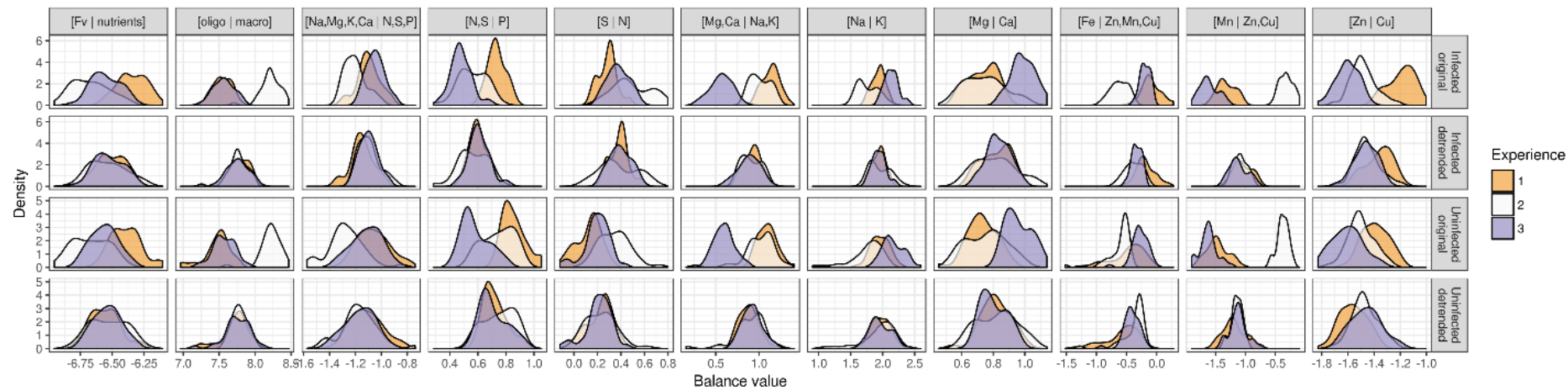
balance. Na is rather a beneficial element analyzed here as macronutrient as  $>1000 \text{ mg kg}^{-1}$  lettuce dry weight (Pilon-Smith et al., 2009).



**Figure 3.1: Bifurcating tree showing 11 hierarchical balances representing a subcomposition of nutrients in the lettuce ionome:** [Fv | Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, Ca, Na, K, S, N, P], [Fe, Mn, Zn, Cu | Mg, Ca, Na, K, S, N, P], [Fe | Mn, Zn, Cu], [Na, Mg, K, Ca | N, S, P], [Mn | Zn, Cu], [Mg, Ca | Na, K], [S, N | P], [Zn | Cu], [Mg | Ca], [Na | K], [S | N]. The experimental effect on nutrient balances was removed prior to data processing using mixed modeling with the nutrient balance as response and the experiment as random intercept (more details in the *Results* section).

The experimental random effect was computed by applying a mixed model to each nutrient balance, with interacting cultivar and treatment (infected or uninfected) as fixed effects and experiment as random intercept effect. This allowed us to compute a random effect on each balance in terms of offsets from the first experiment. After filtering out experimental effects by removing the offset from balance variables, we obtained data centered on the first experiment (**Figure 3.2**) and allowed comparisons of measured features. Using a permissive criterion for

outlier detection, we excluded eight observations where unusual multivariate ionomic balances were detected.



**Figure 3.2: Density curves of balance variables by experiment and treatment before and after detrending the experimental effect.**

### 3.5.2- Effects of cultivars and treatments on the ilr values

**Figure 3.3** presents the effects of cultivars and treatments on scaled and centered ilr values. The effects are computed as linear coefficients of a mixed model with the experimental random effect. The susceptible cultivar VIV and the uninfected treatment were used as the reference categories. All effects should therefore be interpreted as a departure from the uninfected VIV. The infection itself significantly increased the proportion of measured nutrients, as shown by the positive effect of infection on the [Fv | nutrients] balance (**Supplementary Table S1**). While the [oligo | macro], [Mg,Ca | Na,K], [Na | K], [Mg | Ca], [Fe | Mn,Zn,Cu] and [Zn | Cu] balances showed almost no change, infection with BLS had a substantial effect on balances closely related to nitrogen, with a significant decrease in [N,S | P] and a significant increase in [Na,Mg,K,Ca | N,S,P] and [S | N]. The [Mn | Zn,Cu] balance showed a slight but significant increase due to the infection alone.

Cultivars also had different ionome trends, regardless of the treatment (Cultivar section in **Figure 3.3**). It should be emphasized that the effect is considered significant when a significant difference is found between the ionomic balance of a given cultivar and that of VIV. Significance can also be assessed on pairwise comparison by checking if the confidence intervals of the effects overlap. It can be observed from **Figure 3.3** that the [Fv | nutrients], [Na,Mg,K,Ca | N,S,P], [N,S | P] and [Mg | Ca] balances differed markedly for the ionomes of the uninfected cultivars. The [Fv | nutrients] balance differed significantly between the tolerant cultivars and the susceptible ones, with all the susceptible cultivars showing a negative [Fv | nutrients] balance, and the tolerant cultivars, except HOC, showing a positive [Fv | nutrients] balance.

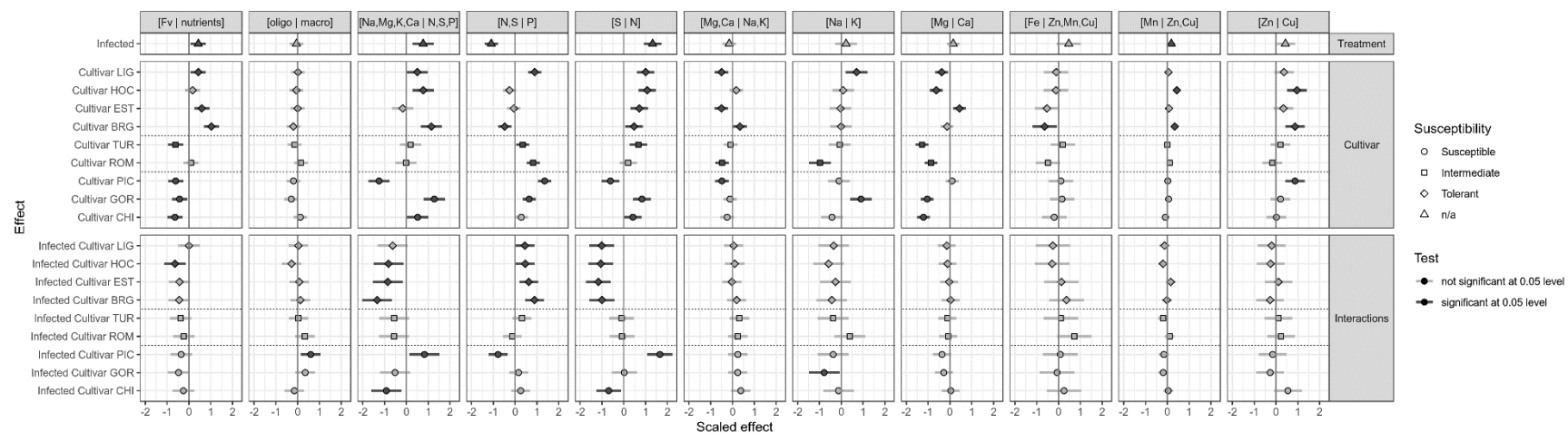
Discriminant analyses were used to show low-dimension swarms of infected and uninfected ionomes of susceptibility groups (susceptible, intermediate, tolerant). The resulting biplots (**Figure 3.4A, B**) show a slight difference due to infection, but significantly different means (non-overlapping 95% level ellipses around means). Susceptibility groups were not aligned through the susceptibility gradient, as would be the case if patterns were linear. While this could be due to non-linear patterns, this behavior could also result from imprecise susceptibility

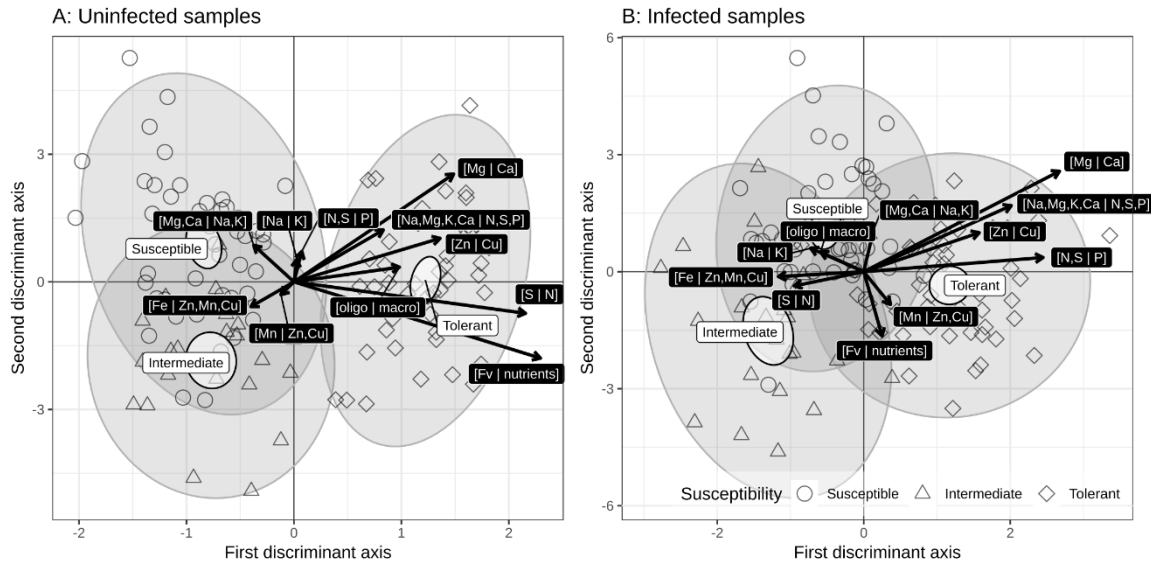
categorization. Nevertheless, tolerant cultivars were characterized by high [Mg | Ca], [Na,Mg,K,Ca | N,S,P], [N,S | P], [Zn | Cu] and [Fv | nutrients] balances and low [Fe | Zn,Mn] and [S | N] balances.

Interactions between infection and cultivars are in addition to infection and cultivar effects considered individually: they show how cultivars reacted differently to the infection as a difference between each interaction and the uninfected VIV cultivar. Here again, confidence intervals should be taken into consideration when evaluating pairwise differences. The most obvious interaction effects are observed for the infected PIC cultivar on balances related to N, S and P, i.e. [Na,Mg,K,Ca | N,S,P], [N,S | P] and [S | N]. There is no cultivar effect on the [Fv | nutrients] balance after infection with *Xcv*, except in the case of the HOC cultivar, which showed a slight but significant decrease. Moreover, no significant interaction effects on balances related to trace elements, i.e. [Fe | Zn,Mn,Cu], [Mn | Zn,Cu] and [Zn | Cu] were detected.

These effects are consistent with the results of the redundancy analysis (RDA, Legendre and Legendre, 2012), which was used to map the effect of the infection on the ionome for each cultivar. The RDA was conducted with a response matrix previously detrended for random effects on nutrient balances (partial RDA conditioned with the experiment returned similar results), as well as features of cultivars and inoculation, and their interactions. The resulting triplot is presented in **Figure 3.5**.







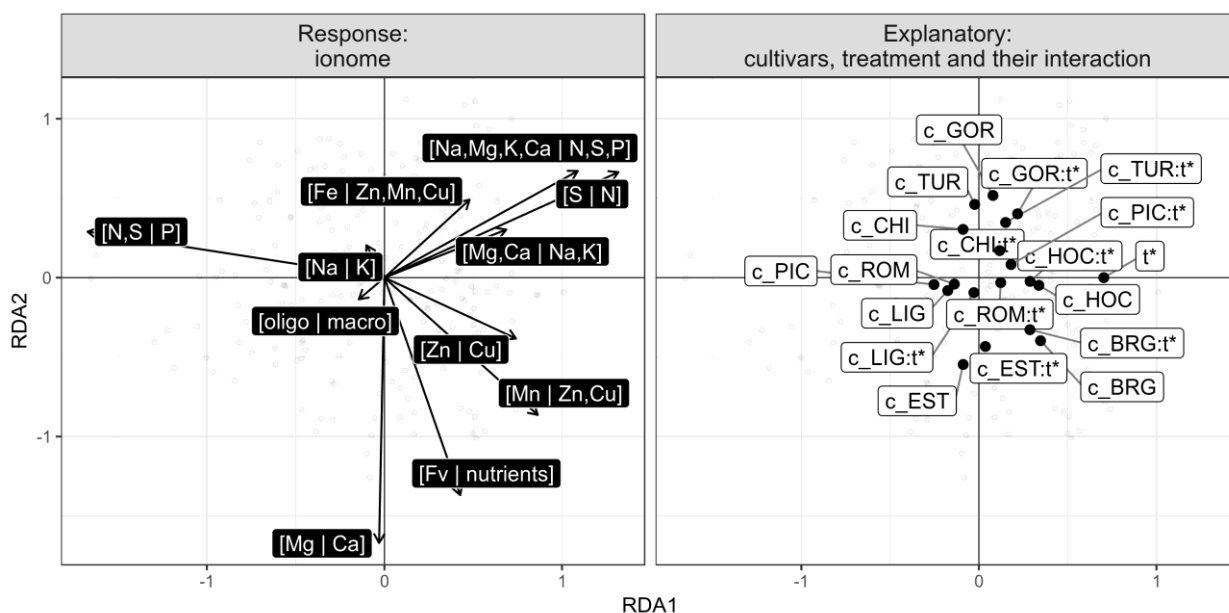
**Figure 3.4: Correlation (scaling 2) biplots of linear discriminant analysis of susceptibility groups for (A) uninfected and (B) infected across BLS infection susceptibility groups of cultivars.**

The RDA summarizes the pattern of variation of the ionome according to the cultivar, the infection (treatment) and their interactions. The angles between vectors, both explanatory and response, reflect their correlation. The RDA confirmed the strong effect of infection on the [N,S | P] balance, where infection tended to shift the nutrient balance toward N,S and away from to P. Indeed, the [N,S | P] arrow is pointing in the opposite direction from the treatment ( $t^*$  and most of its interactions with cultivars, in **Figure 3.5**), indicating that [N,S | P] is negatively correlated with  $t^*$  and most its interactions with cultivars. In a balance perspective, this means that treatment is associated with a decrease of P relatively to N and S - which is the equivalent of an increase of N and S relatively to P. Infection also tended to increase N relative to S, and anions relative to cations in macro elements, i.e. [Na,Mg,K,Ca | N,S,P]. With the exception of the BRG cultivar, all interaction scores are placed on the right of their cultivar scores, but behave heterogeneously on the vertical RDA axis, indicating discrepancies among cultivars in ionic response to the infection, which is confirmed by the significance of the cultivar treatment

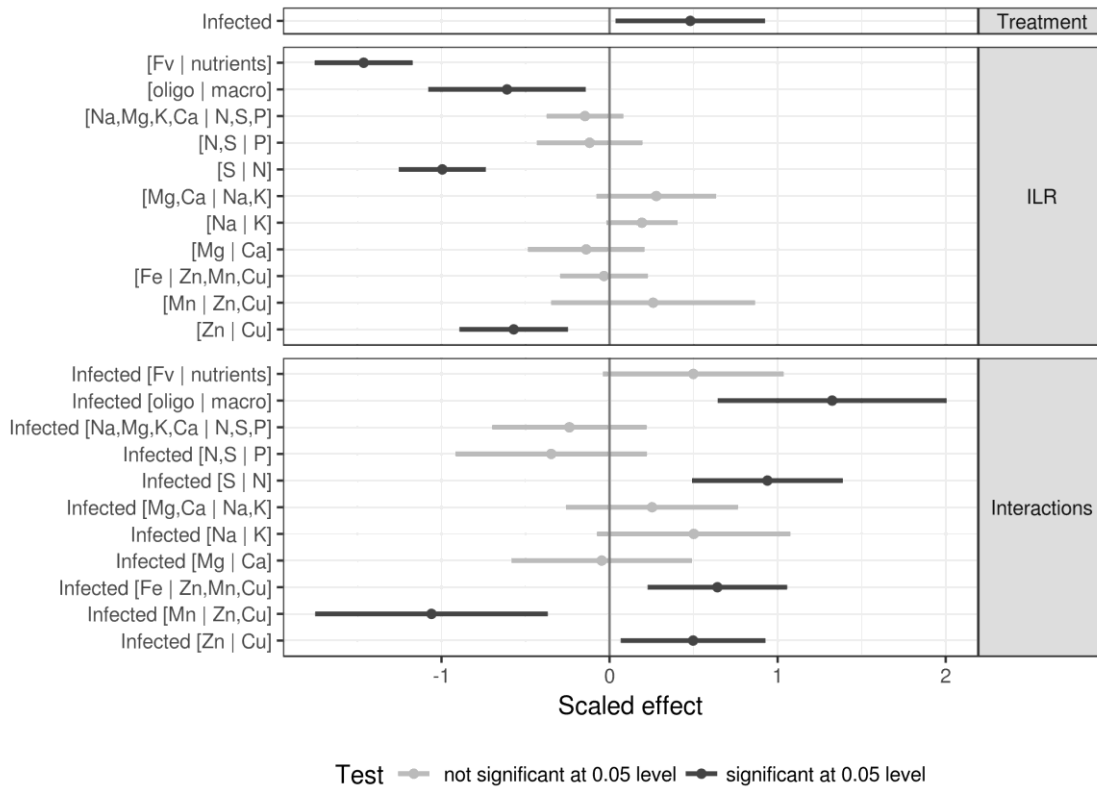
interaction in the permutation test. Indeed, Cultivar ( $P = 0.001$ ), infection ( $P = 0.001$ ) and their interactions ( $P = 0.001$ ) were found to be significant at the 0.05 level

### 3.5.3- Effects of the ionome and BLS infection on resistance

A linear mixed model was performed with the average disease severity index (Nicolas et al., 2018) as response and interacting treatment and centered and scaled ionic balances as features, with the experiment as random intercept. Coefficients and the confidence intervals are shown in **Figure 3.6**.



**Figure 3.5: Redundancy analysis correlation triplot (scaling 2) with ionic balances as response (dark labels) and cultivar, treatment and their interactions as descriptors.** The reference case is the uninfected PIC cultivar, one of the susceptible cultivars chosen at random. c\_ denotes cultivar, t\* infected treatment and: (a colon) interaction.



**Figure 3.6: Linear effects of nutrient balances and infection on the severity index with experiment as random intercept.** Significance was tested at the 0.05 level.

It can be seen from **Figure 3.6** that the infection itself increases the severity index. The severity index was reduced where nutrients loaded more than filling elements, as shown by the significant negative effect of the [Fv | nutrients] balance (significance tested at the 0.05 level). Significant negative trends were also observed for [trace elements | macro elements], [N | S] and [Zn | Cu] balances. Significant effects of similar magnitude were detected in the interactions.

The severity index of infected specimens was higher where trace elements decreased in the [oligoelements | macroelements] balance, where nitrogen increased relative to sulfur in the [S | N] balance and where copper increased relative to zinc in the [Zn | Cu] balance. The trends for these significant effects were opposite to those for their non-interacting counterparts.

The [Fe | Zn,Mn,Cu] balance significantly increased the severity index of infected specimens, while this index decreased with increasing [Mn | Zn,Cu] balance.

### 3.6- Discussion

The lettuce cultivars used in the present study have been characterized for their resistance to BLS by Nicolas et al. (2018). Data exploration revealed significant experimental effects of cultivar and BLS infection, as well as their interactions, on the ionome. Similar directions observed in the coefficients of cultivar and cultivar-treatment interactions could indicate that BLS infection can increase ionomic phenotype differentiation. All lettuce samples used for the mineral characterization were harvested 14 days after inoculation. Considering that lettuce nutritional value is strongly dependent on the growth stage and soil characteristics (Pinto et al., 2014) and that experiments were conducted in a greenhouse with variable temperature and insolation conditions, the discrepancies may be attributed to seasonal effects causing plants to acquire different nutrient balances depending on the specific growth conditions.

The approach proposed by Parent et al. (2013) focuses exclusively on balances between nutrients and does not consider the amounts of individual elements. The interpretation of nutrient balances, which is still uncommon in the field of plant science, offers robust statistics by mapping nutrients to multivariate coordinates as well as generating a sound collection of balances as univariate perspectives. Because elements act in a dependent manner, treating them independently can muddle thinking and interpretation (Baxter, 2015). Evidence that the elements of the ionome are interconnected is the identification of mutants with multi-element phenotypes reported particularly in *Arabidopsis* where many of these phenotypes have been shown to segregate as a single locus and quite a few have been cloned, verifying that a single polymorphism can affect multiple elements (Baxter, 2015). This dependence was recently reported by Zhang et al. (2017) who showed that Zn concentrations can affect nutrient transportation to tea leaves, leading to different distributions of foliar P, S, Al, Ca, Fe and Cu.

Our study found that cultivars had notable ionomic trends, regardless of the treatment (**Figure 3.3**).

The balances [Fv | nutrients], [Na,Mg,K,Ca | N,S,P], [N,S | P] and [Mg | Ca] differed markedly among the ionomes of uninfected cultivars. It is recognized that adequate intracellular concentrations of essential metal ions are required for both pathogen virulence and plant defense (Poschenrieder et al., 2006). Given the essential role of metals in living organisms, either a lack of, or an excess amount of, essential metals may have a profound effect on a wide range of pathogens and by extension, their interactions with the host (Fones and Preston, 2013). Compared to VIV, the [Fv | nutrients] balance differentiated tolerant cultivars from susceptible ones (**Figure 3.3, 3.4**). A positive [Fv | nutrients] value indicates that the geometric mean of nutrients is larger than the filling value. During plant-microbe interactions, high levels of metals can restrict pathogen colonization and be utilized as a defense mechanism by the host (Navarrete and De La Fuente, 2015). Plants absorb high concentrations of metals from the substrate as a self-defense mechanism against pathogens and herbivores (Poschenrieder et al., 2006). These findings are consistent with the results of our study in which tolerant cultivars showed [Fv | nutrient] values higher than those of intermediate and susceptible lettuce cultivars (**Supplementary Table S2**). A study conducted by Maity et al. (2016) on pomegranate (*Punica granatum* L.) found that concentrations of Ca, Mg, Mn and Cu in leaves were significantly higher in germplasm with moderate resistance to bacterial blight disease compared to susceptible ones in which N, K and S were observed to be high. However, in our study, high concentrations of mineral elements initially seemed to favor only tolerant lettuce cultivars despite a tendency toward ionome alteration in all cultivars after infection.

Considering that the lettuce cultivars were grown under identical conditions, differences in their ionome can be attributed to their genetics, naturally causing some of them to absorb more minerals than the others. Differences in the ionomes of plants growing under identical conditions reflect differences in their genomes and genes expression that have evolved through mutation and selection of adapted phenotypes (Neugebauer et al., 2018). A study conducted by Sánchez-Rodríguez et al. (2010) on tomato likewise showed significant differences in the nutrient concentrations of the cultivars even when their growing conditions were identical.

Considering the role of nutrients in plant-pathogen interactions, it seems logical that high [Fv | nutrients] balances are found in cultivars with low susceptibility (**Figure 3.6**). Some plants, called “hyper-accumulators,” are known for their ability to absorb abnormally high levels of mineral elements from the soil which they store in their tissues (Fones and Preston, 2013). The most plausible hypothesis for the evolution of such plants is that hyper-accumulated metals provide a defense against pathogens (Poschenrieder et al., 2006). Although our data cannot be used to validate this hypothesis, they provide some support for it. High levels of metals can restrict host colonization by microbial pathogens and be utilized as a defense mechanism by the host during plant-microbe interactions (Navarrete and De La Fuente, 2015). This seems to be borne out by the results of our study, in which tolerant cultivars had the highest [Fv | nutrients] balance.

Our study showed that tolerant cultivars were characterized by high [Mg | Ca], [Na,Mg,K,Ca | N,S,P], [N,S | P], [Zn | Cu] and [Fv | nutrients] balances and low [Fe | Zn,Mn] and [S | N] balances (**Figure 3.4**). Two tolerant cultivars, HOC and BRG, also showed a positive [Mn | Zn,Cu] balance with a positive effect on infection with *Xcv* (**Figure 3.3**).

Calcium (Ca) is an important nutrient that affects susceptibility to diseases. Ca plays an important role in the stability of plant membranes and is an important component of the cell wall structure, as calcium galacturonates are required in the middle lamella for cell stability (Dordas, 2009). According to Marschner (1995), when Ca is deficient in a plant tissue, low-molecular-weight compounds such as sugars and amino acids leak through the membrane from the cytoplasm to the apoplast, which stimulates infection by pathogens.

Micronutrients are required for the synthesis of secondary metabolites with antimicrobial activity (Poschenrieder et al., 2006). Copper (Cu) can restrict microbial colonization of the host. It is known that *Pseudomonas fluorescens* requires Cu detoxification genes to colonize its host (Zhang and Rainey, 2008). Also, high levels of zinc (Zn) are known to be deleterious for *X. fastidiosa*. Zn plays an important role in protein structure and starch synthesis and is involved in membrane protection from oxidative damage through the detoxification of superoxide

radicals (Calmak, 2000). It is a structural or catalytic cofactor of many proteins (Navarrete and De La Fuente, 2015).

Zinc is a cofactor for over 300 enzymes and 200 transcription factors associated with the maintenance of membrane integrity, auxin metabolism and reproduction (Singh et al., 2016).

In the present study, we found that infection with *Xcv* mainly affected balances closely related to nitrogen (N) with a significant decrease in [N,S | P] and a significant increase in [Na,Mg,K,Ca | N,S,P] and [S | N] (**Figure 3.3**). A decrease in [N,S | P] balance with infection means that the concentration of N and S increases relative to that of P. Similarly, an increase in [Na,Mg,K,Ca | N,S,P] means that the concentration of N, S, and P increases with *Xcv* infection relative to that of Na, K, Mg and Ca. Some essential nutrients have a greater impact on plant diseases than others. Generally, when N levels are deficient, plants are more susceptible to bacterial attack, whereas K and Ca play key roles in forming an effective barrier to infection (Bhaduri et al., 2014). The effect of N on disease severity depends on the type of pathogen. For obligate pathogens such as *Pseudomonas syringae*, low N concentrations lead to a decrease in severity of the disease (Hoffland et al., 2000), whereas the opposite effect is observed in the case of facultative pathogens such as *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Chase, 1989) and some other *Xanthomonas* pathovars (Dordas, 2009).

The ability of a plant to withstand a pathogen depends primarily on the resistance factors involved or the capacity of the host to synthesize or mobilize defense factors. However, whether a plant is resistant or sensitive, it has the ability to initiate a defense reaction (Agrios, 2005) in an attempt to limit disease development. An increase in the N concentration in the host plant might be part of such a strategy to limit the spread of the pathogen.

Significant differences were found in all balances except [oligoelements | macroelements] for at least one uninfected cultivar (**Figure 3.3**). However, with the infection, only six balances showed significant differences. Although ionic univariate differences can be detected in the cultivar-infection interactions, no significant effects emerged from five balances among our set, suggesting that there is some homogeneity in the ability of the host plant to mobilize nutrients



after infection. This disappearance which was also observed in the [Fv | nutrient] balance confirmed the strong effect of *Xcv* infection on the ionome and can be explained by the ability of the host plant to mobilize nutrients after infection.

Because this study showed that tolerant cultivars collectively had a higher [Fv | nutrient] balance than susceptible and intermediate ones (**Figure 3.3, 3.4**), the increase of the [Fv | nutrient] balance with infection (**Figure 3.3**) could enhance the ionic status of cultivars independently of their susceptibility. From a physiological standpoint, this means that overall lettuce tends to absorb more nutrients in response to infection. However, depending on the role of a specific element involved in defense, the plant will either increase or decrease the concentration of this element. Previous studies on other plant-pathogen interactions have found that modifications of the host leaf ionome occurred in response to pathogen attack (De La Fuente et al., 2013; Oliver et al., 2014). However, the change in the ionome which can be described as a nutritional immunity response depends on plant-pathogen interactions (Hood and Skaar, 2012). The present study provides additional evidence of this ability of plants to modify the ionome when infected.

There is evidence in the literature that plant disease symptoms can be associated with increased or unbalanced metal concentration in plant tissue (Fones and Preston, 2013). Kieu et al. (2012) showed that iron availability was the main factor limiting the infection of *Arabidopsis* by *Dickeya dadantii*. Also, data from Kieu et al. (2012) provided evidence that the disease intensity increased after bacterial infection on plants supplied with Fe compared to the iron-starved plants. According to Kieu et al. (2012), the plant iron status plays a key role on the expression of *D. dadantii* pectate lyase isoenzyme-encoding genes, *pelA-pelD*, the major determinants of symptom production on *Arabidopsis*. Our study showed that the [Fe | Zn,Mn,Cu] balance significantly increased the severity index of infected cultivars (**Figure 3.6**). With infection by *Xcv*, lettuce cultivars seem loading less amount of Fe, test significant at 0.005 level (Figure 6), to limit the availability of this element for the pathogen, another strategy that could be part of the nutritional immunity of lettuce.

With the analytical approach used in the present study, the effects of the ionome and BLS infection on resistance showed that infection increased the severity index (**Figure 3.6**). **Figure**

**3.6** presents a model that can be used as a reference to establish proper management strategies for BLS using an ionomic approach. Four balances, [Fv | nutrients], [oligo | macro], [Zn | Cu] and [S | N], negatively affected the severity index.

A preventive strategy based on suitable interpretation of these balances complemented with similar information could help in adjusting fertilization plans, thus enhancing the nutritional capacity of lettuce and increasing protection against BLS. This model can assist in the implementation of curative measures for better management of BLS and could also be extended to other plant-pathogen interactions.

This study showed that the lettuce ionome can be a relevant factor influencing the resistance of cultivars to BLS. Through their capacity to accumulate significant levels of minerals, tolerant cultivars are better able to limit pathogen damage compared to susceptible cultivars. Metal hyperaccumulation was reported by Kazemi-Dinan et al. (2015) as an elemental defense particularly in young plants. Infection of lettuce with *Xcv* resulted in changes in the ionome profile which enhanced cultivars' resistance. Poschenrieder et al. (2006) used the expression "metal fortification" to describe this immune response strategy. Following on studies that have described resistance factors such as stomatal density (Nicolas et al., 2018), the present study shows the protective role played by the ionome in the interaction between lettuce and *Xcv*, which should be taken into consideration in lettuce fertilization and breeding programs. Research should be expanded to other crops interacting with plant pathogens in order to more thoroughly document the relationship between a given plant species' resistance and its ionome. A multidisciplinary approach focusing on proteomics, transcriptomics and metabolomics seems promising. Also, as reported in Huang and Salt (2016), a further study using the ionomics approach may allow the identification of genes involved in tolerance of lettuce to *Xcv*, and be used to design new cultivars with enhance resistance to BLS.

### **3.7- Author contributions statement**

ON and VT conceived and designed the experiments. ON and S-ÉP analyzed the data and wrote the manuscript, with the critical review of MTC, SJ and CB. CB supervised the project. All authors approved the final version of the manuscript.

### **3.8- Funding**

This work was supported by a grant from the Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec (MAPAQ).

### **3.8- Acknowledgments**

We would like to thank Gaston Mercier, Sylvain Lerat, Jean-François Lussier, Mélanie Cadieux, Marie Ciotola and Eric Tsala for providing technical assistance.

### **3.9- Supplemental material**

The Supplementary Material for this article can be found online at:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00351/full#supplementary-material>

### **3.10- References**

Aerts, R., and Chapin, F. S. (2000). The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Adv. Ecol. Res.* 30, 1–67.

Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology: Department of Plant Pathology*, 5th Edn. Gainesville, FL: University of Florida.

Aitchison, J. (1986). *The Statistical Analysis of Compositional Data*. London: Chapman and Hall. doi: 10.1007/978-94-009-4109-0

Baxter, I. (2015). Should we treat the ionome as a combination of individual elements, or should we be deriving novel combined traits? *J. Exp. Bot.* 66,2127–2131. doi: 10.1093/jxb/erv040

Baxter, I. R., Vitek, O., Lahner, B., Muthukumar, B., Borghi, M., Morrissey, J., et al. (2008). The leaf ionome as a multivariable system to detect a plant's physiological status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 12081–12086. doi: 10.1073/pnas.0804175105

Bhaduri, D., Rakshit, R., and Chakraborty, K. (2014). Primary and secondary nutrients-a boon to defense system against plant diseases. *Int. J. Bio Res. Stress Manage.* 5, 461–466. doi: 10.5958/0976-4038.2014.00597.1

Bull, C. T., Gebben, S. J., Goldman, P. H., Trent, M., and Hayes, R. J. (2015). Host genotype and hypersensitive reaction influence population levels of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in lettuce. *Phytopathology* 105, 316–324. doi: 10.1094/PHYTO-07-14-0185-R

Bull, C. T., and Koike, S. T. (2005). Evaluating the efficacy of commercial products for management of bacterial leaf spot on lettuce. *Plant Health Prog.* 6, 1-3. doi: 10.1094/PHP-2005-1121-01-RS

Calmak, I. (2000). Role of zinc in protecting plant cells from reactive oxygen species. *New Phytol.* 146, 185–205. doi: 10.1046/j.1469-8137.2000.00630.x

Chase, A. R. (1989). Effect of nitrogen and potassium fertilizer rates on severity of *Xanthomonas* blight of *Syngonium podophyllum*. *Plant Dis.* 73, 972–975. doi: 10.1094/PD-73-0972

DalCorso, G., Manara, A., Piasentin, S., and Furini, A. (2014). Nutrient metal elements in plants. *Metallomics* 6, 1770–1788. doi: 10.1039/c4mt00173g

De La Fuente, L., Parker, J. K., Oliver, J. E., Granger, S., Brannen, P. M., van Santen, E., et al. (2013). The bacterial pathogen *Xylella fastidiosa* affects the leaf ionome of plant hosts during infection. *PLoS One* 8:e62945. doi: 10.1371/journal.pone.0062945

De Vries, I. M. (1997). Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. *Genet. Resour. Crop Evol.* 44, 165–174. doi: 10.1023/A:1008611200727

Dordas, C. (2009). “Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture: a review,” in *Sustainable Agriculture* eds E. Lichtfouse, M. Navarrete, P. Debaeke, S. Véronique, and C. Alberola (Dordrecht: Springer), 443–460. doi: 10.1007/978-90-481-2666-8\_28

Egozcue, J. J., Pawlowsky-Glahn, V., Mateu-Figueras, G., and Barcelo-Vidal, C. (2003). Isometric log ratio transformations for compositional data analysis. *Math. Geol.* 35, 279–300. doi: 10.1023/A:1023818214614

Filzmoser, P., and Gschwandtner, M. (2017). Mvoutlier: Multivariate Outlier Detection Based

on Robust Methods. R package version 2.0.8. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=mvoutlier>.

Fones, H., and Preston, G. M. (2013). The impact of transition metals on bacterial plant disease. *FEMSMicrobiol. Rev.* 37, 495–519. doi: 10.1111/1574-6976.12004

Hänsch, R., and Mendel, R. R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 259–266. doi: 10.1016/j.pbi.2009.05.006

Havlin, J. L., and Soltanpour, P. N. (1980). A nitric acid plant tissue digest method for use with inductively coupled plasma spectrometry. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 11, 969–980. doi: 10.1080/00103628009367096

Hayes, R. J., Trent, M. A., Truco, M. J., Antonise, R., Michelmores, R. W., and Bull, C. T. (2014). The inheritance of resistance to bacterial leaf spot of lettuce caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in three lettuce cultivars. *Hortic. Res.* 1:14066. doi: 10.1038/hortres.2014.66

Hoffland, E., Jeger, M. J., and van Beusichem, M. L. (2000). Effect of nitrogen supply rate on disease resistance in tomato depends on the pathogen. *Plant Soil* 218, 239–247. doi: 10.1023/A:1014960507981

Hood, M. I., and Skaar, E. P. (2012). Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 525–537. doi: 10.1038/nrmicro2836

Huang, X. Y., and Salt, D. E. (2016). Plant ionomics: from elemental profiling to environmental adaptation. *Mol. Plant* 9, 787–797. doi: 10.1016/j.molp.2016.05.003

Issac, R. A., and Johnson, W. C. (1976). Determination of total nitrogen in plant tissue using a block digester. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 59, 98–100.

Jaradat, A. A., and Goldstein, W. (2018). Diversity of maize kernels from a breeding program for protein quality III: ionome profiling. *Agronomy* 8:9. doi: 10.3390/agronomy8020009

Kazemi-Dinan, A., Barwinski, A., Stein, R. J., Krämer, U., and Müller, C. (2015). Metal hyperaccumulation in Brassicaceae mediates defense against herbivores in the field and improves growth. *Entomol. Exp. Appl.* 157, 3–10. doi: 10.1111/eea.12333

Kieu, N. P., Aznar, A., Segond, D., Rigault, M., Simond-Côte, E., Kunz, C., et al. (2012). Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to *Dickeya dadantii* and *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* 13, 819–827. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00790.x

Lahner, B., Gong, J., Mahmoudian, M., Smith, E. L., Abid, K. B., Rogers, E. E., et al. (2003). Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* 21, 1215–1221. doi: 10.1038/nbt865

Lebeda, A., Doležalová, I., Křístková, E., Dehmer, K. J., Astley, D., Van de Wiel, C. C. M., et al. (2007). Acquisition and ecological characterization of *Lactuca serriola* L. germplasm collected in the Czech Republic, Germany, the Netherlands and United Kingdom. *Gen. Res. Crop Evol.* 54, 555–562. doi: 10.1007/s10722-006-0012-6

Legendre, P., and Legendre, L. F. (2012). *Numerical Ecology*, Vol. 24. Amsterdam: Elsevier.

Lu, H., and Raid, R. (2013). A novel screening method for evaluation of lettuce germplasm for bacterial leaf spot resistance. *HortScience* 48, 171–174. doi: 10.21273/HORTSCI.48.2.171

Maity, A., Sharma, J., Sarkar, A., More, A. K., and Pal, R. K. (2016). Nutrient imbalance indices are closely related with susceptibility of pomegranate to bacterial blight disease. *Sci. Hortic.* 211, 79–86. doi: 10.1016/j.scienta.2016.08.012

Marschner, H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd Edn. London: Academic Press, 889.

Modesto, V. C., Parent, S. -É., Natale, W., and Parent, L. -É. (2014). Foliar nutrient balance standards for maize (*Zea mays* L.) at high-yield level. *Am. J. Plant Sci.* 5, 497–507. doi: 10.4236/ajps.2014.54064

Navarrete, F., and De La Fuente, L. (2015). Zinc detoxification is required for full virulence and modification of the host leaf ionome by *Xylella fastidiosa*. *Mol. PlantMicrobe Interact.* 28, 497–507. doi: 10.1094/MPMI-07-14-0221-R

Neugebauer, K., Broadley, M. R., El-Serehy, H. A., George, T. S., McNicol, J. W., Moraes, M. F., et al. (2018). Variation in the angiosperm ionome. *Physiol. Plant* 163, 306–322. doi: 10.1111/ppl.12700

Nicolas, O., Charles, M. T., Jenni, S., Toussaint, V., and Beaulieu, C. (2018). Relationships between *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* population sizes, stomatal density and lettuce resistance to bacterial leaf spot. *Can. J. Plant Pathol.* 40.3, 399-407 doi: 10.1080/07060661.2018.1495269

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlin, D., et al. (2017). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.4-3. Available at: <http://CRAN.Rproject.org/package=vegan>

Oliver, J. E., Sefick, S. A., Parker, J. K., Arnold, T., Cobine, P. A., and De La Fuente, L. (2014). Ionome changes in *Xylella fastidiosa*-infected *Nicotiana tabacum* correlate with virulence and discriminate between subspecies of bacterial isolates. *Mol. Plant Microbe Interact.* 27, 1048–1058. doi: 10.1094/MPMI-05-14-0151-R

Parent, S. -É., Parent, L. -É., Egozcue, J. J., Rozane, D. E., Hernandez, A., Lapointe, L., et al.

(2013). The plant ionome revisited by the nutrient balance concept. *Front. Plant Sci.* 4:39. doi: 10.3389/fpls.2013.00039

Pilon-Smith, E. A., Quinn, C. F., Tapken, W., Malagoli, M., and Schiavon, M. (2009). Physiological functions of beneficial elements. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 267–274. doi: 10.1016/j.pbi.2009.04.009

Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., and R Core Team. (2017). *Nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. R package version 3.1–131. Available at: <https://cran.r-project.org/web/packages/nlme/index.html>.

Pinto, E., Almeida, A. A., Aguiar, A. A., and Ferreira, I. M. (2014). Changes in macrominerals, trace elements and pigments content during lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth: influence of soil composition. *Food Chem.* 152, 603–611. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.12.023

Poschenrieder, C., Tolra, R., and Barceló, J. (2006). Can metals defend plants against biotic stress? *Trends Plant Sci.* 11, 288–295.

R Development Core Team (2017). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

Robinson, P. E., Jones, J. B., and Pernezny, K. (2006). Bacterial leaf spot of lettuce: relationship of temperature to infection and potential host range of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Plant Dis.* 90, 465–470. doi: 10.1094/PD- 90-0465

Sánchez-Rodríguez, E., del Mar, Rubio-Wilhelmi, M., Cervilla, L. M., Blasco, B., Rios, J. J., et al. (2010). Study of the ionome and uptake fluxes in cherry tomato plants under moderate water stress conditions. *Plant Soil* 335, 339–347. doi: 10.1007/s11104-010-0422-2

Silverman, J. D., Washburne, A. D., Mukherjee, S., and David, L. A. (2017). A phylogenetic transform enhances analysis of compositional microbiota data. *Elife* 6:e21887. doi: 10.7554/eLife.21887

Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., and Prasad, S. M. (2016). Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Front. Plant Sci.* 6:1143. doi: 10.3389/fpls.2015.01143

Toussaint, V. (1999). Bacterial leaf spot, a new disease of lettuce in Quebec caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Phytoprotection* 80, 121–125. doi: 10. 7202/706187ar

van den Boogaart, K. G., and Tolosana-Delgado, R. (2013). *Analyzing Compositional Data with R*, Vol. 122. Berlin: Springer. doi: 10.1007/978-3-642- 36809-7

Wang, Y., Lu, H., Raid, R. N., Nuessly, G. S., and Faroutine, G. (2015). Diverse responses of

lettuce cultivars and germplasm lines to infections of three isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. HortScience 50, 650–655. doi: 10.21273/ HORTSCI.50.5.650

White, P. J., and Brown, P. H. (2010). Plant nutrition for sustainable development and global health. Ann. Bot. 105, 1073–1080. doi: 10.1093/aob/mcq085

Wickham, H., and Chang, W. (2017). ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics. RStudio. R package version 2.2. 1.

Williams, L., and Salt, D. E. (2009). The plant ionome coming into focus. Curr. Opin. Plant Biol. 12, 247–249. doi: 10.1016/j.pbi.2009.05.009

Zhang, X. X., and Rainey, P. B. (2008). Regulation of copper homeostasis in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. Environ. Microbiol. 10, 3284–3294. doi: 10. 1111/j.1462-2920.2008.01720.x

Zhang, Y., Wang, Y., Ding, Z., Wang, H., Song, L., Jia, S., et al. (2017). Zinc stress affects ionome and metabolome in tea plants. Plant Physiol. Biochem. 111, 318–328. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.12.014

### **3.11- Conflict of interest statement**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Nicolas, Charles, Jenni, Toussaint, Parent and Beaulieu. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



**Supplementary Table S1. Ionome composition of lettuce cultivars used in this study, infected with *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* and uninfected.**

		Nutrient composition $\pm$ S.E. (mg kg <sup>-1</sup> dry tissue)										
Cultivars		Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	N	P	S	Zn
BRG	inf. <sup>1</sup>	11044 $\pm$ 1393	13.17 $\pm$ 4.47	73.8 $\pm$ 9.9	65154 $\pm$ 11784	3090 $\pm$ 265	123.7 $\pm$ 62.4	4590 $\pm$ 1524	42262 $\pm$ 865	6818 $\pm$ 1406	2773 $\pm$ 349	88.7 $\pm$ 8.6
	un.	10610 $\pm$ 408	11.67 $\pm$ 0.95	105.2 $\pm$ 20.0	64777 $\pm$ 2498	3091 $\pm$ 95	128.2 $\pm$ 19.2	4167 $\pm$ 314	38049 $\pm$ 1872	7187 $\pm$ 384	2923 $\pm$ 72	83. $\pm$ 3.0
CHI	inf.	8302 $\pm$ 1743	9.67 $\pm$ 3.63	53.0 $\pm$ 6.9	48594 $\pm$ 12207	2881 $\pm$ 192	130.9 $\pm$ 78.1	3372 $\pm$ 755	33448 $\pm$ 800	5381 $\pm$ 1232	2091 $\pm$ 419	65.7 $\pm$ 10.7
	un.	8132 $\pm$ 325	6.92 $\pm$ 0.34	60.6 $\pm$ 5.0	46468 $\pm$ 4114	2978 $\pm$ 80	125.9 $\pm$ 21.3	3333 $\pm$ 294	31866 $\pm$ 1387	5972 $\pm$ 418	2132 $\pm$ 138	62.1 $\pm$ 1.7
EST	inf.	13152 $\pm$ 1852	11.42 $\pm$ 3.73	69.3 $\pm$ 7.9	56345 $\pm$ 8417	3306 $\pm$ 306	118.0 $\pm$ 60.9	3773 $\pm$ 1199	37528 $\pm$ 2300	6253 $\pm$ 1269	2440 $\pm$ 230	80.3 $\pm$ 8.7
	un.	12574 $\pm$ 379	9.17 $\pm$ 0.47	83.4 $\pm$ 9.0	57440 $\pm$ 1704	3250 $\pm$ 68	125.3 $\pm$ 17.1	3729 $\pm$ 250	31560 $\pm$ 1450	6625 $\pm$ 323	2416 $\pm$ 47	75.7 $\pm$ 1.8
GOR	inf.	7725 $\pm$ 1137	8.42 $\pm$ 2.27	51.7 $\pm$ 7.0	51111 $\pm$ 10416	2798 $\pm$ 262	122.9 $\pm$ 64.8	2904 $\pm$ 755	36067 $\pm$ 1031	5960 $\pm$ 1313	1941 $\pm$ 459	68.2 $\pm$ 6.9
	un.	7887 $\pm$ 385	8.25 $\pm$ 0.41	59.9 $\pm$ 3.3	54252 $\pm$ 1926	2769 $\pm$ 58	126.3 $\pm$ 19.6	2648 $\pm$ 236	28228 $\pm$ 1084	6473 $\pm$ 358	2053 $\pm$ 107	70.7 $\pm$ 1.9
HOC	inf.	8869 $\pm$ 2212	11.33 $\pm$ 3.96	66.4 $\pm$ 8.9	51269 $\pm$ 10679	2797 $\pm$ 273	112.7 $\pm$ 59.1	3570 $\pm$ 972	36244 $\pm$ 734	5508 $\pm$ 1167	2185 $\pm$ 301	74.7 $\pm$ 11.0
	un.	9148 $\pm$ 406	10.50 $\pm$ 0.70	69.4 $\pm$ 5.1	57340 $\pm$ 2812	2954 $\pm$ 81	102.9 $\pm$ 13.8	3573 $\pm$ 286	38969 $\pm$ 1311	6405 $\pm$ 499	2328 $\pm$ 143	74.2 $\pm$ 2.8
LIG	inf.	11782 $\pm$ 1457	10.58 $\pm$ 2.78	72.8 $\pm$ 14.5	63410 $\pm$ 9495	3600 $\pm$ 188	154.5 $\pm$ 88.4	3397 $\pm$ 921	39788 $\pm$ 1402	7521 $\pm$ 1180	2413 $\pm$ 214	81.2 $\pm$ 9.1
	un.	10982 $\pm$ 621	9.17 $\pm$ 0.53	73.6 $\pm$ 8.6	60964 $\pm$ 1881	3338 $\pm$ 90	141.3 $\pm$ 23.8	3180 $\pm$ 279	40080 $\pm$ 1835	7534 $\pm$ 351	2283 $\pm$ 165	75.7 $\pm$ 3.7
PIC	inf.	9736 $\pm$ 1361	9.08 $\pm$ 3.55	47.7 $\pm$ 7.8	47289 $\pm$ 9260	2819 $\pm$ 278	118.0 $\pm$ 62.6	3252 $\pm$ 759	35387 $\pm$ 984	5478 $\pm$ 1069	1825 $\pm$ 390	58.6 $\pm$ 4.8
	un.	10204 $\pm$ 430	8.50 $\pm$ 0.48	60.2 $\pm$ 7.0	47982 $\pm$ 1694	2822 $\pm$ 64	129.2 $\pm$ 22.0	3176 $\pm$ 220	25828 $\pm$ 2465	5993 $\pm$ 338	1973 $\pm$ 107	61.6 $\pm$ 1.6
ROM	inf.	10629 $\pm$ 2050	10.33 $\pm$ 3.87	53.6 $\pm$ 7.0	54931 $\pm$ 13863	3521 $\pm$ 210	116.5 $\pm$ 64.6	3995 $\pm$ 1274	37356 $\pm$ 1354	6458 $\pm$ 1630	2284 $\pm$ 279	79.3 $\pm$ 11.1
	un.	10168 $\pm$ 455	7.92 $\pm$ 0.50	75.7 $\pm$ 9.4	50020 $\pm$ 5296	3444 $\pm$ 65	118.2 $\pm$ 17.8	4002 $\pm$ 215	29628 $\pm$ 1412	7018 $\pm$ 397	2300 $\pm$ 87	74.0 $\pm$ 2.8
TUR	inf.	7913 $\pm$ 2250	9.00 $\pm$ 2.83	50.0 $\pm$ 9.2	48441 $\pm$ 10471	2847 $\pm$ 267	135.0 $\pm$ 77.2	3393 $\pm$ 1096	32732 $\pm$ 1115	5323 $\pm$ 1063	1843 $\pm$ 411	65.8 $\pm$ 8.0
	un.	7653 $\pm$ 557	7.67 $\pm$ 0.45	57.1 $\pm$ 5.2	46820 $\pm$ 1567	2840 $\pm$ 73	121.2 $\pm$ 19.1	3309 $\pm$ 386	26561 $\pm$ 1272	5604 $\pm$ 275	1880 $\pm$ 65	64.5 $\pm$ 1.7
VIV	inf.	10884 $\pm$ 1817	10.58 $\pm$ 4.17	61.9 $\pm$ 8.2	58974 $\pm$ 11065	2968 $\pm$ 271	128.5 $\pm$ 61.7	3540 $\pm$ 1096	38691 $\pm$ 1901	5942 $\pm$ 1145	2465 $\pm$ 318	81.8 $\pm$ 12.6
	un.	10596 $\pm$ 475	8.25 $\pm$ 0.41	64.3 $\pm$ 2.7	56895 $\pm$ 2363	2937 $\pm$ 75	128.7 $\pm$ 19.0	3640 $\pm$ 267	35464 $\pm$ 2240	6253 $\pm$ 361	2495 $\pm$ 96	75.2 $\pm$ 1.3

<sup>1</sup>inf.: infected, un.: uninfected

**Supplementary Table S2. Mineral concentration in infected and uninfected lettuce cultivars according to their group of resistance to BSL.**

Resistance group <sup>1</sup>	Nutrient composition $\pm$ S.E. (mg kg <sup>-1</sup> dry tissue)										
	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	N	P	S	Zn
TOLER. inf. <sup>2</sup>	11212 $\pm$ 1729	11.63 $\pm$ 3.73	70.6 $\pm$ 10.3	59044 $\pm$ 10094	3198 $\pm$ 258	127.2 $\pm$ 67.7	3833 $\pm$ 1154	38955 $\pm$ 1325	6528 $\pm$ 1255	2453 $\pm$ 274	81.2 $\pm$ 9.3
un.	10828 $\pm$ 453	10.13 $\pm$ 0.66	82.9 $\pm$ 10.7	60130 $\pm$ 2224	3158 $\pm$ 84	124.5 $\pm$ 18.5	3662 $\pm$ 282	37164 $\pm$ 1617	6938 $\pm$ 389	2488 $\pm$ 107	77.2 $\pm$ 2.9
INTER. inf.	9271 $\pm$ 2150	9.665 $\pm$ 3.35	51.8 $\pm$ 8.1	51686 $\pm$ 12167	3184 $\pm$ 238	125.7 $\pm$ 71.0	3694 $\pm$ 1185	35044 $\pm$ 1234	5890 $\pm$ 1347	2063 $\pm$ 345	72.6 $\pm$ 9.6
un.	8910 $\pm$ 506	7.80 $\pm$ 0.47	66.4 $\pm$ 7.3	48420 $\pm$ 3431	3142 $\pm$ 69	119.7 $\pm$ 18.4	3656 $\pm$ 300	28094 $\pm$ 1342	6311 $\pm$ 336	2090 $\pm$ 76	69.2 $\pm$ 2.3
SUSC. inf.	9162 $\pm$ 1515	9.43 $\pm$ 3.40	53.6 $\pm$ 7.5	51492 $\pm$ 10737	2866 $\pm$ 251	125.1 $\pm$ 66.8	3267 $\pm$ 841	35898 $\pm$ 1179	5690 $\pm$ 1190	2081 $\pm$ 397	68.6 $\pm$ 8.7
un.	9205 $\pm$ 403	7.98 $\pm$ 0.41	61.2 $\pm$ 4.5	51399 $\pm$ 2524	2876 $\pm$ 69	127.5 $\pm$ 20.5	3199 $\pm$ 254	30346 $\pm$ 1794	6173 $\pm$ 369	2163 $\pm$ 112	67.4 $\pm$ 1.6

<sup>1</sup>TOLER.: tolerant group, INTER.: intermediate group and SUSC.: susceptible group.

<sup>2</sup>inf.: infected, un.: uninfected

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

#### 4.1- Le comportement des cultivars de laitue à la TBL

Les résultats de cette étude ont contribué à une première classification de 10 cultivars de laitue de la collection d'Agriculture et Agroalimentaire Canada sur la base de leur sensibilité à la TBL. Cette classification basée sur une adaptation de la méthode décrite par Bull et al., (2015) a permis d'établir 3 groupes de sensibilité. Ces résultats ont été obtenus dans un contexte expérimental où toutes les conditions (température, humidité, brumisation) de développement de la maladie étaient optimales. Cette classification a été effectuée en considérant la feuille la plus nécrosée compte tenu de l'uniformité de l'inoculation sur les faces adaxiales et abaxiales. Cependant, la méthode d'évaluation utilisée dans cette présente étude ne serait pas la mieux adaptée à un contexte de plein champ où les plantes seraient exposées à l'arrivée éventuelle de nouvel inoculum. Par conséquent, une méthode d'évaluation basée sur une pondération de l'indice de sévérité de chaque feuille serait meilleure. D'un point de vue comparatif, l'indice moyen de sévérité de la TBL devrait être associé au contexte expérimental et devrait tenir compte de la virulence de la souche de *Xcv* utilisée.

Cette présente étude montre que les cultivars les plus sensibles appartiennent aux laitues romaines, ce qui supporte les observations de Wang et al. (2015). Les laitues romaines ont des feuilles étalées comparativement aux feuilles imbriquées des autres types de laitue, ce qui pourrait en partie expliquer leur plus grande sensibilité à la TBL. Parmi les dix cultivars étudiés, les cultivars BRG et LIG étaient des plus tolérants, ce qui a été également démontré par Bull et al. (2007). La présence du gène de résistance *Xar 1* a été rapportée chez le cultivar LIG (Hayes et al. 2014). En ce qui concerne les autres cultivars tolérants comme BRG, EST et HOC, aucun gène de résistance n'a été rapporté à date dans la littérature. Il a été démontré par nos travaux que les populations de *Xcv* se multiplient très lentement sur les cultivars BRG et LIG.

Toutefois, les cultivars EST et HOC, tout en étant tolérants, ont supporté de plus fortes populations de l'agent pathogène, ce qui suggère une résistance plutôt horizontale chez ces cultivars. D'autres caractéristiques en lien avec la résistance comme la l'épaisseur et la composition chimique de la cire, de la cutine, la présence de lenticelles, de même que la structure des cellules épidermiques sont autant de facteurs qui pourraient être pris en compte dans des études ultérieures pour expliquer le niveau de sensibilité de la laitue à la TBL.

#### **4.2- Contribution des stomates à la résistance de la laitue à la TBL**

Les résultats de cette étude établissent également que les stomates, en plus de leur rôle physiologique, constituent également un facteur de résistance à la TBL. Les stomates sont les principales ouvertures naturelles que les bactéries, incluant *Xcv* (Underwood et al., 2007) utilisent pour infecter les plantes (Melotto et al., 2008). Plusieurs études dont Ryan et al. (2011) et Montillet et Hirt (2013) ont discuté du rôle joué par les stomates dans l'infection des plantes par les microorganismes pathogènes. Considérant l'importance des stomates dans ce processus, l'hypothèse d'une corrélation entre densité de stomates et sensibilité à la TBL était alors plausible, ce que nos travaux ont confirmé. La méthode microscopique utilisée pour le décompte des stomates n'a pas permis une étude détaillée de leurs caractéristiques morphoanatomiques (cellules de garde, ostiole). Une étude plus poussée de ces caractéristiques pourrait se révéler intéressantes.

#### **4.3- Contribution des éléments minéraux à la résistance de la laitue à la TBL**

Notre étude a montré également que les cultivars de laitue présentent des caractéristiques ionomiques en lien avec leur résistance à la TBL. Parmi les éléments nutritifs, 17 éléments sont considérés comme essentiels à la croissance et au développement des plantes (Singh et al., 2013). Les éléments essentiels utilisés en plus grandes proportions (>0.1 % de la matière sèche) sont des macroéléments comme le carbone (C), l'hydrogène (H), l'oxygène (O), le phosphore (P), le potassium (K), le calcium (Ca), le magnésium (Mg), l'azote (N), et le soufre (S). Tandis que, ceux utilisés en plus faibles quantités par la plante (<0.01 % de la matière sèche) comme

le manganèse (Mn), le bore (B), le cuivre (Cu), le molybdène (Mo), le fer (Fe), le zinc (Zn) et le chlore (Cl) sont des microéléments (Williams and Salt, 2009). Nos analyses statistiques ont privilégié une approche basée sur les balances nutritionnelles, telles que proposées par Parent et al. (2013) car elles permettent des analyses statistiques plus robustes. Le choix de cette approche se justifie en partie par le fait que les éléments sont absorbés par la plante et interagissent de manière dépendante, les analyser de façon indépendante pourrait porter à des confusions et à de fausses interprétations (Baxter, 2015)

Il a été démontré par nos travaux que les balances [Vr | éléments], [Na,Mg,K,Ca | N,S,P], [N,S | P] et [Mg | Ca] affectent significativement les cultivars. Aussi, la balance [Vr | éléments] différencie de manière significative les cultivars décrits (Nicolas et al., 2018) tolérants de ceux sensibles. Il est connu que dans le contexte des interactions plantes-pathogènes, que de fortes concentrations en éléments minéraux peuvent limiter la colonisation de la plante hôte par l'agent pathogène (Navarette et De la Fuente, 2015). Selon Poschenrieder et al. (2006), les plantes absorbent des concentrations minérales élevées comme un mécanisme de défense contre les agents pathogènes et les herbivores. Les résultats de nos travaux supportent une telle théorie car les cultivars tolérants présentent une balance [Vr | éléments] significativement plus élevée que celle des cultivars intermédiaires et sensibles. Certains éléments jouent un rôle important en défense, dans les interactions plantes pathogènes, par exemple le Cu peut limiter la colonisation de *Pseudomonas fluorescens* (Zang and Rainay, 2008); d'autres microéléments sont nécessaires pour la synthèse de métabolites secondaires (Poschenrieder et al., 2006). Le Cu a été rapporté pour ses effets bactéricide : il peut affecter l'ADN, l'intégrité de la membrane inhiber la respiration (Gras et al., 2011). Le Zn a été également rapporté pour son rôle délétère pour *Xyllela fastidiosa*; le Zn joue un rôle important dans la structure des protéines et la synthèse d'amidon ainsi que la protection de la membrane.

Toutefois, il faut reconnaître que les modifications ionomiques effectuées par la laitue lorsqu'elle est infectée par *Xcv* ne sont pas sans impact sur sa croissance et son développement. La plante doit assez souvent faire un compromis entre sa croissance ou sa défense, d'ailleurs rapportée par Albrect et Argueso (2016).

Aussi, en situation de défense la plante va adopter une régie nutritionnelle plus défensive que nutritive qui peut lui être parfois préjudiciable. Notre travail a mis en évidence comment les

balances nutritionnelles sont affectées par la présence de l'agent pathogène. Des études ultérieures visant à quantifier les modifications nutritionnelles imputables à l'attaque de l'agent pathogène particulièrement chez des cultivars résistants pourrait permettre d'ajuster la nutrition minérale de la plante en vue de favoriser ses mécanismes de défense.

Nos résultats nous ont porté à envisager, dans un contexte de lutte intégrée contre la TBL, les effets d'un traitement à base de sulfate de Cu et sulfate de Zn sur la TBL (Annexe 1 b). Ces résultats ont montré qu'il est possible de diminuer de façon significative la sévérité de la TBL chez tous les cultivars sensibles et le cultivar intermédiaire ROM (Annexe 1 a). Considérant que les éléments minéraux peuvent avoir des effets indirects dans la défense via leur inclusion dans des metalloenzymes tel que le superoxide dismutase (SOD) avec ses cofacteurs métalliques Fe, Mn, Cu et Zn (Wu et al., 2011), la réduction de la sévérité de la TBL par le traitement préalable au  $\text{CuSO}_4$  et  $\text{ZnSO}_4$  peut être due à la fois à un effet direct de la solution minérale ou un effet indirect lié à sa capacité d'élucider la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS), rendant de ce fait les laitues moins susceptibles à la TBL.

Notre étude montre également que l'infection avec *Xcv* affecte l'ionome des cultivars, particulièrement les balances contenant de l'azote, par une diminution significative de la balance [N, S | P] et une augmentation significative des balances [Na, Mg, K, Ca | N, S, P] et [S | N]. Certains éléments ont un impact plus considérable que d'autres. L'effet de l'azote sur la sévérité des maladies dépend de l'agent pathogène. Chez les parasites obligatoires comme *Pseudomonas syringae*, de faibles concentrations en N entraînent une diminution de la sévérité de la maladie (Hoffland et al., 2000) tandis que l'effet contraire est observé chez les parasites facultatifs comme *X. vesicatoria* (Chase, 1989).

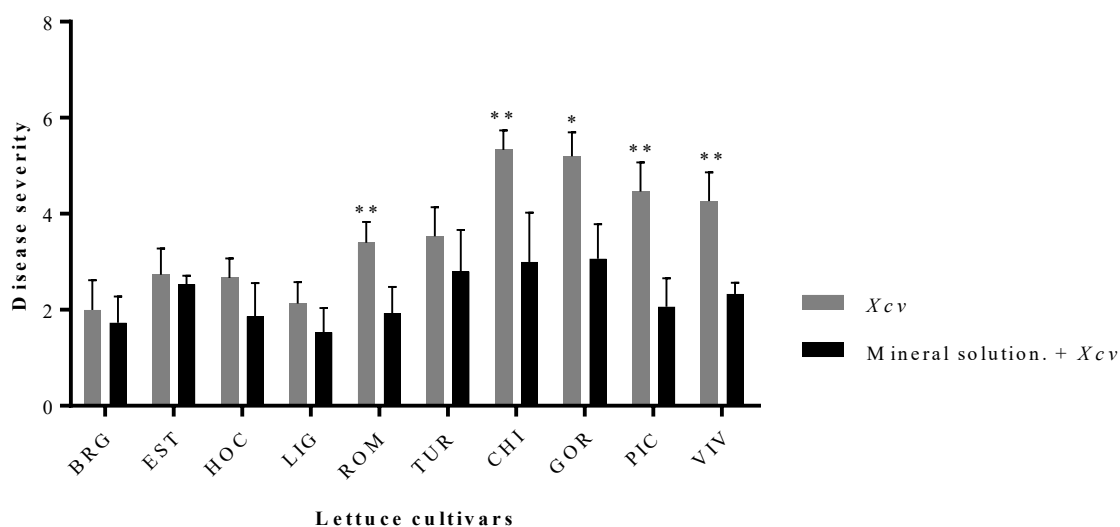
Toujours dans un souci de lutte contre la TBL, nos travaux ont montré que le traitement préalable de la laitue avec des UV-C améliore sa résistance à cette maladie (Annexe 2). Des travaux complémentaires sur l'extraction de la lettucenine A et la microscopie ont été également effectués et ont fait l'objet d'un troisième article annexé à la présente thèse.

#### **4.4- Conclusion**

Cette étude a permis de mettre en évidence que les stomates et la composition ionomique sont des facteurs contribuant à la résistance de la laitue à la TBL. Ces travaux fournissent de nouveaux outils à la fois aux améliorateurs par la possibilité d'intégrer ces nouveaux paramètres dans leur programme d'amélioration et aussi aux programmes de fertilisation de développer ou d'ajuster leurs plans en vue d'obtenir de meilleurs rendements agricoles tout en stimulant les mécanismes de défense naturel de la plante. Il serait par conséquent intéressant de faire des études similaires avec d'autres pathosystèmes (incluant d'autres plantes et/ou d'autres agents pathogènes) en vue d'élaborer des modèles plus robustes pouvant servir de référence ultérieurement.

## ANNEXE

### Annexe 1a



**Figure Annexe 1a : Effet d’une solution minérale à base de cuivre et de zinc sur la TBL.** Des laitues de 4 semaines de croissance ont été prétraitées avec une solution  $\text{CuSO}_4$  et  $\text{ZnSO}_4$  (1g/l chacune) et inoculées 72h plus tard avec *Xcv* ( $10^8$  cfu). Les symptômes ont été évalués 14 jours après l’inoculation. Les astérisx signifient que le traitement était significatif ( $p < 0.05$ ).



## Annexe 1b



**Figure-Annexe 1b : Diminution des symptômes de la TBL due au traitement préalable à la solution minérale de cuivre et de zinc. Le cultivar Chief montrant les symptômes de la TBL : traité avec la solution minérale (à gauche); témoin (à droite)**

## Annexe 2 : Évaluation préliminaire de l'impact des UV-C sur la TBL

Un autre volet de recherche a été envisagé initialement dans le but de proposer des moyens de lutte contre la TBL. Des cultivars de laitues ont été par conséquent traités à de faibles doses d'UV-C connu pour ses effets bactéricides et ses capacités à induire des mécanismes de défense chez les plantes. Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'un troisième article qui a été soumis et accepté pour publication dans *Acta horticulturae*. Étant donné que ces travaux ne faisaient pas partie du projet de recherche tel que formulé au départ, l'article est plutôt présenté ici en annexe.

### Preliminary evaluation of the impact of preharvest UV-C on lettuce: potential for the control of *Xanthomonas campestris*

O. Nicolas<sup>1,2</sup>, M.T. Charles<sup>2a</sup>, D. Chabot<sup>3</sup>, Jawad Aarrouf<sup>4</sup>, S. Jenni<sup>2</sup>, V. Toussaint<sup>2</sup> and C. Beaulieu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Université de Sherbrooke, QC, Canada, J1K 2R1; <sup>2</sup>Saint-Jean-sur-Richelieu Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Saint-Jean-sur-Richelieu, QC, Canada, J3B 3E6; <sup>3</sup>Ottawa Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, ON, Canada, K1A 0C6; <sup>4</sup>UMR-Qualisud, Université d'Avignon, 84916 Avignon Cedex, France.

#### Abstract

Two lettuce (*Lactuca sativa*) cultivars, the susceptible 'Chief' and the tolerant 'Little Gem', were used to study the effect of ultraviolet-C (UV-C) light on bacterial leaf spot (BLS) development. Potted plants were irradiated every 48 h with UV-C to obtain a cumulative dose of 1.6 kJ m<sup>-2</sup> over a period of 8 d. Inoculation with *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* was performed 2 d after the last UV-C treatment. Then, 14 d after inoculation, the severity of BLS was assessed on the lettuce seedlings using a six-point scale (0–6). Lettucenin, a known antimicrobial molecule of lettuce, was extracted from controlled and treated tissues and assayed by ultra-performance liquid chromatography. For the susceptible cultivar 'Chief', the severity of BLS was markedly reduced on the UV-C-treated plants in comparison with the non-UV-C-treated plants. The BLS severity scores for 'Chief' were 2.66 and 5.16 in the UV-C-treated plants and the controls, respectively. Ultraviolet-C treatment did not significantly affect the BLS severity index (<2) in the tolerant cultivar 'Little Gem'. The lettucenin A content in the leaves was significantly higher in the tolerant cultivar than in the susceptible cultivar. Ultrastructural changes induced by UV-C on the surface of lettuce leaves were observed by scanning electron microscopy. These observations revealed the occlusion of the stomata of UV-C-treated leaves by a wax-like matrix that remains to be fully characterized. This occlusion seemed partial in the susceptible cultivar and more complete in the tolerant cultivar. The results of this preliminary work suggest a potential antibacterial role of lettucenin in the natural tolerance of lettuce against *X. campestris*. However, the beneficial effect of UV-C treatment on BLS severity seems to be related at least in part to ultrastructural modifications that restrict the access of the pathogen to the stomatal chamber.

**Keywords: bacterial leaf spot, disease resistance, phytoalexin, stomata, UV-C hormesis**

## INTRODUCTION

In recent decades, safety and environmental protection issues have led to reconsideration of the use of agrochemicals and have highlighted the need to develop sustainable and economic strategies to control plant diseases. Alternative strategies to limit damage in harvested products and to improve natural plant defence mechanisms have therefore attracted greater interest. One such technique, the use of by ultraviolet-C (UV-C) light hormesis, has been extensively studied, but almost exclusively in postharvest crops (Charles and Arul, 2007; Shama, 2007). When applied to postharvest commodities, UV-C likely induces a multicomponent defence response (Charles et al., 2011; Ouhibi et al., 2015), including the elicitation of pathogenesis-related proteins, the *de novo* synthesis and accumulation of phytoalexins, and the modification and reinforcement of structural barriers.

Recently, a few studies have addressed the potential benefits of UV-C application on growing crops. Preharvest UV-C irradiation has been reported to reduce powdery mildew on apple and strawberry leaves (Van Hemelrijck et al., 2010) as well as *Botrytis cinerea* infection in geranium (*Pelargonium × hortorum*) (Darras et al., 2015). The positive effect of UV-C appears to be linked to the reinforcement of cell walls through the apposition of callose in *Arabidopsis* (Mintoff et al., 2015) and to the accumulation of antimicrobial compounds in lettuce leaves, where an increase in the concentration of total phenols was described (Vàquez et al., 2017).

Bacterial leaf spot (BLS) of lettuce (*Lactuca sativa*) caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* (Xcv) is one of the main constraints of lettuce production worldwide. Managing resistance is one of the most sustainable control strategies for BLS (Bull et al., 2015), since no pesticides are registered to control this disease. Vázquez et al., (2017) reported that UV-C treatment enhanced lettuce resistance to *B. cinerea*. Decreased bacterial counts and the reduction of disease symptoms were also reported in UV-C-treated *Arabidopsis thaliana* infected with *Pseudomonas syringae* (Shapiro and Zhang, 2001). It is also known that lettuceenin A is the major phytoalexin produced in lettuce subjected to biotic or abiotic stress (Yean et al., 2009). However, less is known about the effect of UV-C treatment on BLS. The objectives of the present study were to evaluate the responses of two lettuce cultivars to preharvest application of UV-C treatment and to evaluate how UV-C modifies the interaction of Xcv with lettuce.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant production

Two lettuce cultivars, one tolerant to BLS ('Little Gem') and one susceptible to BLS ('Chief'), as classified by Nicolas et al. (2018, accepted), were used in this study. Seeds were sown in seedling trays containing peat moss (Pro-Mix; Premier Tech, Saint-Rémi, QC, Canada) as the growth substrate. The seedlings were placed in a growth chamber, where the temperature was kept at 18 °C (day) and 16 °C (night), with 70% relative humidity and a 16-h photoperiod. After 21 d, the seedlings were transplanted into 15-cm-diameter pots filled with the same growth substrate.

### UV-C treatment and inoculation

The first UV-C treatment was performed 5 d after transplanting. The potted plants were irradiated every 48 h with UV-C at 0.4 kJ m<sup>-2</sup>, for a cumulative dose of 1.6 kJ m<sup>-2</sup> over a period of 8 d. Then, 48 h after the last UV-C treatment, the lettuce plants were infected with the rifampicin-resistant *X. campestris* pv. *vitians* strain B07-007. The uninfected and UV-C control plants were sprayed with saline buffer (NaCl at 8.5 g/L) only. All the plants were incubated in a greenhouse

misting room. Then, 14 d after inoculation, the severity of BLS was assessed on the plants treated with UV-C and their corresponding controls according to an adaptation of the method described by Nicolas et al. (2018, accepted).

### Sampling and lettuценin analysis

Lettuce leaves were sampled from both the control and the treated plants at the completion of UV-C treatment and after inoculation with *Xcv* ( $T_1$ ), at 72 h ( $T_2$ ), and at 7 d ( $T_3$ ). The samples were frozen in liquid nitrogen and kept at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis. Lettucenin extraction and analysis were adapted from Yean et al. (2009) and Hanawa et al. (1995). Briefly, the compound of interest was extracted from the samples with methanol and recovered by partitioning with ethyl acetate. For ultra-performance liquid chromatography (UPLC), separation (Acquity UPLC HSS T3 column;  $1.8\text{ }\mu\text{m}$ ,  $100 \times 2.1\text{ mm}$ ) and detection (photodiode array, 446 nm) were carried out using a Waters Acquity UPLC system (Waters Corp., Milford, MA, USA) operated with the Waters MassLynx 4.1 software.

### Scanning electron microscopy

For scanning electron microscopy (SEM), leaf pieces measuring about  $8 \times 10\text{ mm}$  were dissected in a 100 mM phosphate buffer solution, pH 6.8, and transferred to a fixative solution consisting of 3% glutaraldehyde in the same buffer. After postfixation in 1% osmium tetroxide, the samples were dehydrated in graded ethanol series (30% to 100%) and dried with a critical point dryer (Biodynamics Research Corp., Rockville, MD, USA). The dried specimens were mounted on aluminium stubs and gold-coated with an Emitech K550V gold sputter coater (EM Technologies Ltd., Ashford, Kent, UK) before examination with a Quanta 600 scanning electron microscope (FEI Company, Brno, Czech Republic) at 20 kV with spot size of 2.5.

## RESULTS AND DISCUSSION

### UV-C treatment decreases BLS severity in lettuce

Figure 1 depicts BLS symptoms evaluated 14 d after inoculation. Treatment with UV-C reduced BLS symptoms in the irradiated lettuce plants (Figure 1A and C) in comparison with the non-irradiated control plants (Figure 1B and D). Treatment with UV-C caused a decrease in the BLS severity index in both tested cultivars (Figure 2). The severity index was reduced by 48% and 30% in the susceptible cultivar ‘Chief’ and the tolerant cultivar ‘Little Gem’, respectively. However, significant differences between the UV-C treated plants and their corresponding controls were observed only for the susceptible cultivar ‘Chief’ ( $P = 0.008$ ).

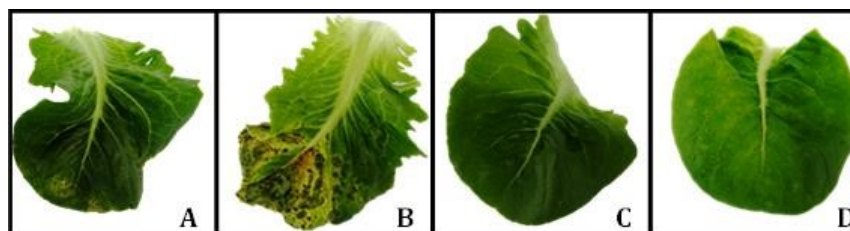


Figure 1. Effect of preharvest ultraviolet-C (UV-C) treatment on bacterial leaf spot symptoms assessed 14 d after inoculation. (A) and (B) Susceptible cultivar ‘Chief’; (C) and (D) tolerant cultivar ‘Little Gem’; (A) and (C) UV-C-treated leaves; (B) and (D) non-UV-C-treated control leaves.

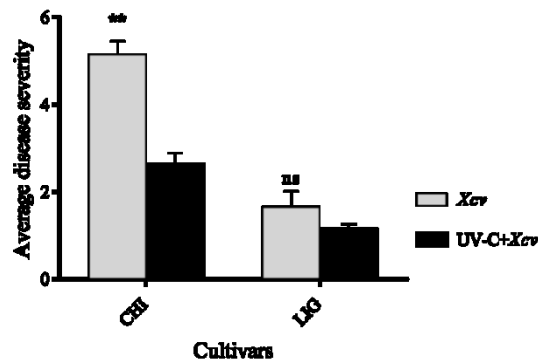


Figure 2. Effect of preharvest ultraviolet-C (UV-C) treatment on bacterial leaf spot disease severity index. Disease severity was evaluated 14 d after inoculation. *Xcv*, *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*; CHI, susceptible cultivar ‘Chief’; LIG, tolerant cultivar ‘Little Gem’. \*\*,  $P = 0.008$ ; ns, not significant.

The increase in the BLS tolerance of lettuce induced by preharvest UV-C observed in the present study is in agreement with the study by Vázquez et al. (2017). Those authors found a 30% decrease in the sensitivity of preharvest UV-C-treated lettuce to *B. cinerea*.

Light is known to be an important regulator of plant–pathogen interactions, but little information is available about the effect of preharvest UV-C on the stimulation of plant defence mechanisms (Urban et al., 2016). However, there is a large body of evidence showing that, in postharvest crops, UV-C is an effective activator of multiple defence responses (Charles et al., 2011). In UV-C-treated tomato fruit, improved resistance against *B. cinerea* was associated with *de novo* synthesis of pathogenesis-related proteins and of the phytoalexin rishitin as well as with the reinforcement of structural barriers through lignification and suberization. The possibility that UV-C induces cell wall reinforcement through other mechanisms is supported by the study by Mintoff et al. (2015), who demonstrated that sub-lethal UV-C induces callose along with several other defence-related genes in *Arabidopsis thaliana*.

### Effect of UV-C on lettucenin

A previous study conducted by Bennett et al. (1994) confirmed that lettucenin was the principal phytoalexin in lettuce. It was also demonstrated that lettucenin had an important antibacterial effect, particularly on *Xanthomonas campestris*, given that bacterial growth was negatively correlated to lettucenin concentration (Yean et al., 2009).

Significant differences were found in the expression of lettucenin between the two cultivars (Figure 3). Although lettucenin was absent in the uninfected susceptible cultivar (Figure 3A), this defence molecule was found in all samples of the tolerant cultivar, whether irradiated or not (Figure 3B). The fact that lettucenin was found in the non-induced tolerant cultivar points to a role for this defence molecule, along with other factors such as stomatal density (Nicolas et al., 2018, accepted) and the ionome (Nicolas, 2018), in its tolerance to *Xcv*. Ultraviolet-C treatment alone was not able to induce the phytoalexin in the susceptible cultivar. Although the lettucenin titre remained at a steady level in the non-irradiated tolerant cultivar, a marked increase ( $P < 0.05$ ) in lettucenin in this cultivar was observed 7 d after the end of UV-C treatment.

After infection, lettucenin was detected in the susceptible lettuce cultivar but only after 7 d in both the control and the UV-C-treated plants (Figure 3C). Considering that UV-C is generally reported to be a good inducer of phytoalexins in plant tissues (Charles and Arul, 2007; Urban et

al., 2016), it was surprising that the level of lettucenin found in the UV-C-treated susceptible cultivar was lower than the level found in its non-irradiated control. Interestingly, in the tolerant cultivar, UV-C caused an earlier increase in the lettucenin titre (Figure 3D). The dynamics of lettucenin accumulation in the tolerant cultivar supports a role for this molecule in an effective defence against pathogens (Bennett et al., 1994; Yean et al., 2009). Nevertheless, our data do not provide any evidence for a potential role of this phytoalexin in the improved resistance observed in the susceptible cultivar in response to preharvest UV-C treatment.

### **Surface modifications induced by UV-C treatment**

Observations with SEM (Figures 4 and 5) revealed that UV-C treatment affected the surface of the lettuce leaves. Stomata are the principal route for pathogen entry (Melotto et al., 2008, and the susceptibility or tolerance of lettuce to BLS was found to be strongly dependent on stomatal density (Nicolas et al., 2018, accepted). Ultraviolet-C treatment apparently induced stomatal closure in both the BLS-susceptible (Figure 4C) and the BLS-tolerant (Figure 4D) cultivars. By closing its stomata, the lettuce leaf greatly limits the invasion of its tissue by the pathogen, and that might have resulted in a significant decrease in BLS symptoms in the plants treated with UV-C. At 8 d after inoculation, although the pathogenic bacteria were rarely found in the tissues, further differences were observed between the control plants (Figure 5A and B) and the UV-C-treated plants (Figure 5C and D) of both cultivars. Wax deposits were found to be clogging the stomatal apertures of the UV-C-treated leaves. The clogging material was apparently apposed on open stomata in the susceptible cultivar 'Chief' (Figure 5C), whereas the stomata of the tolerant cultivar 'Little Gem' (Figure 5D) likely remained closed and were covered by a thin film of an amorphous material. Considering the key role played by stomata in plant physiology, it is likely that the UV-C-induced loss of stomatal functionality, resulting from complete or partial closure, could be detrimental because of its negative impacts on photosynthesis and, consequently, on growth and development.

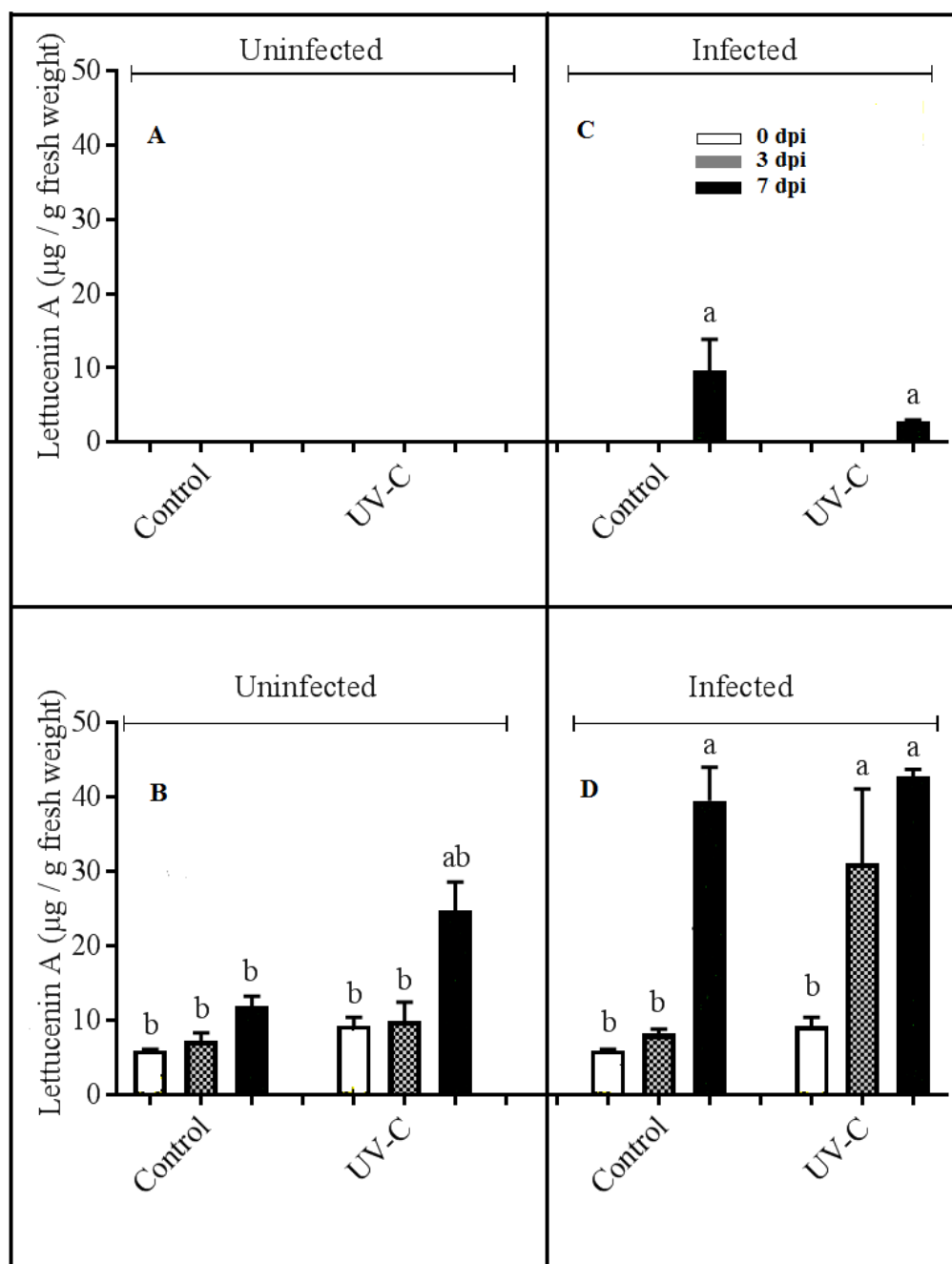


Figure 3. Effect of preharvest ultraviolet-C (UV-C) treatment and *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* infection on in lettucenin in lettuce leaves. (A) Non-inoculated cultivar 'Chief'; (B) non-inoculated cultivar 'Little Gem'; (C) inoculated cultivar 'Chief'; (D) inoculated cultivar 'Little Gem'. dpi, days post-inoculation. Mean values with the same lower case letters are not significantly different ( $P < 0.05$ ).

At higher magnification, the surface of the UV-C-treated leaves appeared smoother with fewer ridges, and this observation was more evident for the susceptible cultivar (Figure 5C) than

for the tolerant one (Figure 5D). Similar modifications of epicuticular wax deposits were previously observed in UV-C-treated tomato (Charles et al., 2008). These ultrastructural modifications may have prevented bacteria cell adhesion and thereby reduced the ability of bacteria to infect. It is worth mentioning that, at the visible scale, there were no distinguishable differences in appearance between the UV-C-treated leaves and the non-irradiated leaves of both lettuce cultivars. Therefore, the results of the present study are in line with the work by Birmpa et al. (2013), who reported that a single treatment with UV-C at  $0.54 \text{ kJ m}^{-2}$  did not negatively impact the colour and appearance of fresh-cut lettuce. Moreover, a recent study by Vázquez et al. (2017) found that repeated applications of UV-C at  $0.85 \text{ KJ m}^{-2}$  to a total cumulative dose of  $3.4 \text{ KJ m}^{-2}$  were not harmful to lettuce plants. Nonetheless, further studies are needed to establish whether repeated preharvest UV-C treatments can impact yield and other parameters associated with lettuce quality.

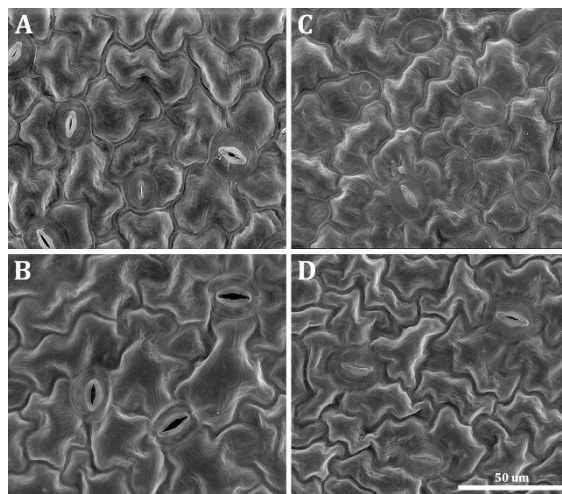


Figure 4. Scanning electron micrographs of lettuce leaves 48 h after the application of a cumulative ultraviolet-C dose of  $1.6 \text{ kJ m}^{-2}$ . (A) Non-irradiated control leaf of the cultivar 'Chief'; (B) non-irradiated leaf of the cultivar 'Little Gem'; (C) irradiated leaf of 'Chief'; (D) irradiated leaf of 'Little Gem'.

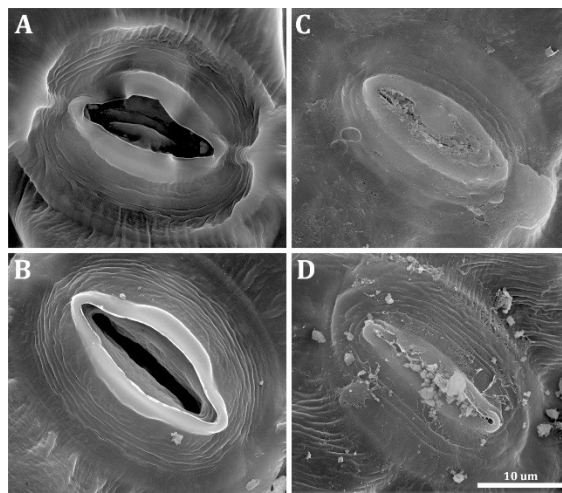




Figure 5. Scanning electron micrographs of lettuce leaves showing the effect of a 1.6 kJ m<sup>-2</sup> cumulative dose of ultraviolet-C radiation. Samples were taken from the leaves 8 d after inoculation with *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. (A) Non-irradiated control leaf of the cultivar 'Chief'; (B) non-irradiated control leaf of the cultivar 'Little Gem'; (C) irradiated leaf of 'Chief'; (D) irradiated leaf of 'Little Gem'.

## CONCLUSION

This study provides evidence that preharvest application of UV-C may be an alternative to improve the resistance of lettuce to BLS. Further studies are necessary to develop preharvest UV-C as a suitable environmentally friendly approach that can be considered for inclusion in the integrated management of BLS.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the AgriInnovation Program of Agriculture and Agri-Food Canada's (AAFC's) Growing Forward 2 Policy Framework through Organic Science Cluster II. The authors are grateful to Daniel Rolland, Dominique Roussel, Marie Ciotola, Mélanie Cadieux, Gabrielle Archambault, and Philippe Plamondon for their technical assistance. Appreciation is also extended to Jérôme Boutin, Karine Frechette, and Bertrand Riendeau for their care of the plants during the experiments.

## Literature cited

- Barak JD, Koyke ST, Gylbertson RL (2001). The role of crop debris and weeds in the epidemiology of bacterial leaf spot of lettuce in California. *Plant Dis.* 85,169-178
- Bennett, M.H., Gallagher, M.D.S., Bestwick, C.S., Rossiter, J.T., and Mansfield, J.W. (1994). The phytoalexin response of lettuce to challenge by *Botrytis cinerea*, *Bremia lactucae* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 44, 321–333.
- Birmpa, A., Sfika V., and Vantarakis, A. (2013). Ultraviolet light and ultrasound as non-thermal treatments for the inactivation of microorganisms in fresh ready-to-eat foods. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 96–102.
- Bull, C.T., Gebben, S.J., Goldman, P.H., Trent, M., and Hayes, R.J. (2015). Host genotype and hypersensitive reaction influence population levels of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in lettuce. *Phytopathology* 105, 316–324.
- Charles, M.T., and Arul, J. (2007). UV treatment of fresh fruits and vegetables for improved quality: a status report. *Stewart Postharvest Rev.* 3 (3), 1–8.
- Charles, M.T., Arul, J., and Benhamou, N. (2011). UV-C-induced disease resistance in tomato fruit is a multi-component and time-dependent system. *Acta Hortic.* 905, 251–260.
- Charles, M.T., Makhoulf, J., and Arul, J. (2008). Physiological basis of UV-C-induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit: II. Modification of fruit surface and changes in fungal colonization. *Postharvest Biol. Technol.* 47, 21–26.
- Darras, A.I., Bali, I. and Argyropoulou, E. (2015). Disease resistance and growth responses in *Pelargonium hortorum* plants to brief pulses of UV-C irradiation. *Scientia Horticulturae*, 181, 95-101.
- Hanawa, F., Kanauchi, M., Tahara, S., and Mizutani, J. (1995). Lettucenin A as a phytoalexin of dandelion and its elicitation in dandelion cell cultures. *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.* 66, 151–162.

- Huang, J.-S., 1986. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Ann Rev. Phytopathol* 24, 141–57
- Lu, H., Raid, R., 2013. A Novel Screening Method for Evaluation of Lettuce Germplasm for Bacterial Leaf Spot Resistance 48, 171–174
- Melotto, M., Underwood, W., He, S. Y., 2008. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu. Rev. phytopathol.* 46, 101.
- Mintoff, S.J.L., Rookes, J.E., and Cahill, D.M. (2015). Sub-lethal UV-C radiation induces callose, hydrogen peroxide and defence-related gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 17, 703–711.
- Montillet J-L, Hirt H. 2013. New checkpoints in stomatal defense. *Trends Plant Sci.* 18, 295–297.
- Nicolas, O., Charles, M.T., Jenni, S., Toussaint, V. and Beaulieu, C. (2018). Relationships between *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* population sizes, stomatal density and lettuce resistance to bacterial leaf spot. *Can. J. Plant. Pathol.* 40(3), 399-407.
- Ouhibi, C., Attia, H., Nicot, P., Urban, L., Lachaâl, M., and Aarrouf, J. (2015). Effect of UV-C radiation on resistance of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.) against *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia minor*. *J. Phytopathol.* 163, 578–582.
- Shama, G. (2007). Process challenges in applying low doses of ultraviolet light to fresh produce for eliciting beneficial hormetic responses. *Postharvest Biol. Technol.* 44, 1–8.
- Shapiro, A.D., and Zhang, C. (2001). The role of *NDR1* in avirulence gene-directed signaling and control of programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127, 1089–1101.
- Toussaint V. 1999. Bacterial leaf spot, a new disease of lettuce in Quebec caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Phytoprotection.* 80:121–125.
- Urban, L., Charles, F., de Miranda, M.R.A., and Aarrouf, J. (2016). Understanding the physiological effects of UV-C light and exploiting its agronomic potential before and after harvest. *Plant Physiol. Biochem.* 105, 1–11.
- Van Hemelrijck, W., Van Laer, S., Hoekstra, S., Aiking, A., and Creemers, P. (2010). UV-c radiation as an alternative tool to control powdery mildew on apple and strawberry. *Proceedings Ecofruit, 14th International Conference on Organic Fruit-Growing*. Hohenheim, Germany, 22–24 February 2010. p.99–105.
- Vásquez, H., Ouhibi, C., Lizzi, Y., Azzouz, N., Forges, M., Bardin, M., Nicot, P., Urban, L., and Aarrouf, J. (2017). Pre-harvest hormetic doses of UV-C radiation can decrease susceptibility of lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.) to *Botrytis cinerea* L. *Sci. Hortic.* 222, 32–39.
- Yean, H.C., Atong, M., and Chong, K.P. (2009). Lettucenin A and its role against *Xanthomonas campestris*. *J. Agric. Sci.* 1 (2), 87–93.

## BIBLIOGRAPHIE

Abramovitch, R. B., Anderson, J. C. and Martin, G.B. (2006). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7, 601-11.

Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. 5th eds. Department of Plant Pathology. University of Florida. (United States of America). pp. 209-248

Albrecht, T., and Argueso, C. T. (2016). Should I fight or should I grow now? The role of cytokinins in plant growth and immunity and in the growth–defence trade-off. *Annals of botany*, 119, 725-735.

Alfano J.R. et Collmer A. (2004) Type III secretion system effector proteins: Double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 385-414.

Al-Saleh M.A., Ibrahim Y.E., Abo-Elyousr K.A.M., Alibrahim J.S. (2011). Population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* on different plant species and management of bacterial leaf spot of lettuce under greenhouse conditions. *Crop. Prot.* 30, 883-887.

Andreu, A., Guevara, M., Wolski, E., Daleol, G. and Caldiz, D. (2006). Enhancement of natural disease resistance in potatoes by chemicals. *Pest Manag. Sci.* 2, 162-170.

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M. and Sheen, J. (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415, 977-83.

Aung, K., Jiang, Y. and He, S.Y., (2018). The role of water in plant-microbe interactions. *Plant J.* 93, 771-780.

Baker, C. J., Orlandi, E. W. and Mock, N.M. (1993). Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiol.* 102, 1341-1344.

Barak JD, Koike S.T, Gylbertson RL (2001). The role of crop debris and weeds in the epidemiology of bacterial leaf spot of lettuce in California. *Plant Dis.* 85,169-178.

Barak, J. D., Koike, S. T, and Gilbertson, R. L. (2002). Movement of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in the stems of lettuce plants. *Plant Pathol.* 51, 506-512.

Baxter, I.R., Vitek, O., Lahner, B., Muthukumar, B., Borghi, M., Morrissey, J., Guerinot, M.L. and Salt, D.E. (2008). The leaf ionome as a multivariable system to detect a plant's physiological status. *P. Natl. Acad. Sci.* 105, 12081-12086.

Baxter, I. (2015). Should we treat the ionome as a combination of individual elements, or should we be deriving novel combined traits? *J. Exp. Bot.* 66, 2127-2131.

Beattie, G.A., and Lindow, S.E. (1995). The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33, 145-172.

Benhamou N. et Picard K. (1999). La résistance induite, une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection* 80, 137-168.

Benhamou, N. (2009). La résistance chez les plantes: principes de la stratégie défensive et applications agronomiques. Éd. Tec et Doc.

Benhamou N. et Rey P. (2012). Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. : I. Principes de la résistance induite *Phytoprotection* 92, 1-23.

Bennett, M. H., (1994). The phytoalexin response of lettuce to challenge by *Botrytis cinerea*, *Bremia latucae* and *Pseudomonas syringae* pv. *Physiol. Mol. Plant P.* 44, 321-333.

Bent, A. F. and Mackey, D. (2007). Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol.* 45, 399-436.

Bent, A. F. (1996). Plant disease resistance genes: Function meets structure. *The Plant Cell*, 8, 1757.

Bestwick, L., (1994). Accumulation of the phytoalexin lettuceenin a and changes in 3-hydroxy-3, methylglutaryl coenzyme a reductase activity in lettuce seedlings with the red spot disorder. *Phytochemistry* 39, 775-777.

Bestwick, C. S., Bennett, M. H., and Mansfield, J. W. (1995). Hrp mutant of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* induces cell wall alterations but not membrane damage leading to the hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol.* 108, 503-516.

Bhattacharjee, R., and Dey, U. (2014). An overview of fungal and bacterial biopesticides to control plant pathogens/diseases. *Afr. J. Microbiol. Res.* 8, 1749-1762.

Blanvillain, S. (2007). Etudes des récepteurs TonB-dépendants et d'un nouvel effecteur de type III de la bactérie *phytopathogène Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.

Blanvillain, S., Meyer, D., Boulanger, A., Lautier, M., Guynet, C., Denancé, N. and Arlat, M. (2007). Plant carbohydrate scavenging through TonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PLoS one*, 2 e224.

- Bogdanove, A. J., Schornack, S. and Lahaye, T. (2010). TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 394–401.
- Boucher C., Genin S. and Arlat M. (2001) Concepts actuels sur la pathogénie chez les bactéries phytopathogènes. *C.R. Acad. Sci. Paris* 324: 915-922.
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding". *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brown P.H., Bellaloui N., Wimmer M.A., Bassil E.S., Ruiz J., Hu H., Pfeiffer H., Dannel F., and Romheld V. (2002). Boron in plant biology. *Plant Biol.* 4, 205-223.
- Bull C., T. (2010). Developement of management strategies for bacterial leaf spot and corky root of lettuce. California leafy greens research program, Annual report. 8p.
- Bull CT, Koike, S.T. (2005). Evaluating the efficacy of commercial products for management of bacterial leaf spot on lettuce. *Plant Health Prog.* 6,1-3.
- Bull, C. T., Goldman, P. H., Hayes, R., Madden, L. V., Koike, S. T., and Ryder, E., 2007. Genetic diversity of lettuce for resistance to bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Plant Health Prog.* 8, 1-11.
- Bull, C. T., Gebben, S. J., Goldman, P. H., Trent, M., and Hayes, R. J., (2015). Host genotype and hypersensitive reaction influence population levels of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in lettuce. *Phytopathology.* 105, 316-324.
- Calmak I.M. (2000). Role of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytol.* 146, 185–205.
- Carisse, O., Ouimet, A., Toussaint, V., and Pillion, V. (2000). Evaluation of the effect of seed treatments, bactericides, and cultivars on bacterial leaf spot of lettuce caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Plant Dis.* 84, 295-299.
- Castro, M. S. and Fontes, W. (2005). Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept. Lett.* 12, 13-8.
- Chang, J.H., Goel, A.K., Grant, S.R. and Dangl, J.L. (2004). Wake of the flood: ascribing functions to the wave of type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Microbiology* 7, 11–18.

Chase A.R. (1989). Effect of nitrogen and potassium fertilizer rates on severity of *Xanthomonas* blight of *Syngonium podophyllum*. Plant Dis. 73, 972–975.

Cho, M.H. and Lee, S.W. (2015). Phenolic phytoalexins in rice: biological functions and biosynthesis. Int. J. Mol. Sci. 16, 29120-29133.

Chou, F. L. *et al.* (1997). The *Xanthomonas campestris gumD* gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. Biochem. Biophys. Res. Com. 233, 265–269.

Cornelis G.R. and Van Gijsegem F. (2000) Assembly and function of type III secretory systems. Annu. Rev. Microbiol. 54, 735-774.

Dai, G. H., Nicole, M., Andary, C., Martinez, C., Bresson, E., Boher, B. and Geiger, J. P. (1996). Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and callose-rich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and cotton. Physiol. Mol. Plant P. 49, 285-306.

Dar, G. H., Anand, R. C. and Sharma, P. K. (1993). Genetically engineered microorganisms to rescue plants from frost injury. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 50, 1–19.

Das, A., Rangaraj, N. and Sonti, R. V. (2009). Multiple adhesin-like functions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are involved in promoting leaf attachment, entry, and virulence on rice. Mol. Plant Microbe Interact. 22, 73–85.

Davis, K. R., Darvill, A. G., Albersheim, P., and Dell, A. (1986). Host-pathogen interactions XXIX. Oligogalacturonides released from sodium polypectate by endopolygalacturonic acid lyase are elicitors of phytoalexins in soybean. Plant physiol. 80, 568-577.

Davis, R. M., Subbarao, K. V., Raid, R. N., and Kurtz, E. A. (Eds.). (1997). Compendium of lettuce diseases. (APS press MN, USA), pp. 15-16.

De Vries, I.M. and Van Raamsdonk, L.W.D., (1994). Numerical morphological analysis of lettuce cultivars and species (*Lactuca* sect. *Lactuca*, *Asteraceae*). Plant Syst. Evol. 193, 125-141.

De Vries, I.M., (1997). Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. Genet. Resour. Crop. Ev. 44, 165-174.

Dordas, C., (2009). Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture: a review. Agron. Sustain. Dev. 28, 33-46.

Dumas, M.T., Strunz, G.M., Hubbes, M. and Jeng, R.S. (1983). Isolation and identification of six mansonones from *Ulmus americana* infected with *Ceratocystis ulmi*. Experientia. 39, 1089.

FAOStat, F. (2017). FAO Statistics Division

Fatima, U. and Senthil-Kumar, M., (2015). Plant and pathogen nutrient acquisition strategies. *Front. Plant Sci.* 6, 750.

Felix, G. and Boller, T. (2003). Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J Biol Chem.* 278, 6201-8.

Felix, G., Duran, J. D., Volko, S. and Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18, 265-76.

Fett W.F., Gerard H.C., Moreau R.A., Osman S.F. and Jones L.E. (1992) Screening of nonfilamentous bacteria for production of cutin-degrading enzymes. *Appl. Environ. Microbiol* 58, 2123-2130.

Feys, B. J. and Parker, J.E. 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet.* 16, 449-55.

Fones, H., and Preston, G. M. (2013). The impact of transition metals on bacterial plant disease. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 495-519.

Galletti, R., De Lorenzo, G., and Ferrari, S. (2009). Host-derived signals activate plant innate immunity. *Plant Signal. Behav.* 4, 33-34.

Giesemann, A., Biehl, B. and Lieberii, R. (1986). Identification of scopoletin as a phytoalexin of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *J. Phytopathol.* 117, 373-376.

Gómez-Gómez, L., Bauer, Z. and Boller, T. (2001). Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 1155-63.

Gómez-Gómez, L. (2004). Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Mol. Immunol.* 41, 1055-1062.

Graham D.R. (1983). Effects of nutrients stress on susceptibility of plants to disease with particular reference to the trace elements. *Adv. Bot. Res.* 10, 221-276.

Graham D.R., Webb M.J. (1991). Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. *Micronutrients in agriculture*. Soil Science Society of America, pp 329-370.

.

Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M. and Dangl, J. L. (2006). Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 60, 425-449.

Gudesblat, G.E., Torres, P.S., and Vojnov, A.A. (2009). *Xanthomonas campestris* overcomes Arabidopsis stomatal innate immunity through a DSF cell-cell signal-regulated virulence factor. *Plant Physiol.* 149, 1017–1027.

Gürlebeck D., Thieme F. and Bonas U. (2006). Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *Journal of Plant Physiol.* 163, 233-255.

Hajri A., Brin C., Hunault G., Lardeux F., Lemaire C., Manceau C., Boureau T. & Poussier S. (2009) A "repertoire for repertoire" hypothesis: repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. *PLoS One* 4: e6632.

Hammerschmidt, R. (1999). Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 285-306.

Hancock, J. F., (2004) *Plant Evolution and the Origin of Crop Species*, 2nd ed., Wallingford: CABI Publishing.

Hänsch, R. and Mendel, R.R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 259-266.

Harborne, J.B. (1999). The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochem. Syst. Ecol.* 27, 335-367.

Hardham, A. R., Jones, D. A. and Takemoto, D. (2007). Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 342-348.

Hayes, R. J., Trent, M. A., Truco, M. J., Antonise, R., Michelmore, R. W., Bull, C. T., 2014. The inheritance of resistance to bacterial leaf spot of lettuce caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in three lettuce cultivars. *Hortic. Res.* 1, 14066.

Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Rev. Microbiol.* 7, 263–273.

Hirano, S. S., Upper, C. D., (2000). Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae*—a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 64, 624-653.

Hoffland, E., Jeger, M. J., and van Beusichem, M. L. (2000). Effect of nitrogen supply rate on disease resistance in tomato depends on the pathogen. *Plant Soil* 218, 239-247.



Huang, J. S., (1986). Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24, 141-157.

Huber, D. M., Graham, R. D., and Rengel, Z. (1999). The role of nutrition in crop resistance and tolerance to diseases. *Mineral nutrition of crops: fundamental mechanisms and implications.* (Ed. Z Rengel), 169-204.

Hugouvieux, V., Barber, C.E., and Daniels, M.J. (1998). Entry of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* into hydathodes of *Arabidopsis thaliana* leaves: a system for studying early infection events in bacterial pathogenesis. *Mol Plant-Microbe Interact.* 11, 537–543.

Jeffree, C.E. (1996). Structure and ontogeny of plant cuticles. *Plant cuticles: an integrated functional approach.* Bios Scientific Publishers, Oxford, G.-B.

Jones, D. A., and Jones, J. D. (1997). The role of leucine-rich repeat proteins in plant defenses. *Adv. Bot. Res.* 24, 89-167

Jones J.D., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.

Jones, D. A., and Jones, J. D. (1997). The role of leucine-rich repeat proteins in plant defenses. *Adv. Bot. Res.* 24, 89-167

Keinath, P.A., and Loria, R. (1996). Management of common scab of potato with plant nutrients. In: Engelhard W.A. (Ed.), *Management of Diseases with Macro- and Microelements.* (APS, Minneapolis, USA) pp. 152–166

Kesseli, R. V., Ochoa, O., and Michelmore, R. W. (1991). Variation at RFLP loci in *Lactuca* spp. and origin of cultivated lettuce (*L. sativa*), *Genome.* 34, 430-436

King, A. et G. Young. 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am. Diet. Assoc.* 99, 213- 218.

Kingsley, M. T., Gabriel, D. W., Marlow, G. C., and Roberts, P. D. (1993). The *opsX* locus of *Xanthomonas campestris* affects host range and biosynthesis of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide. *J. Bacteriol.* 175, 5839–5850.

Klarzynski, O., and Fritig, B. (2001). Stimulation des défenses naturelles des plantes. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie* 324, 953-963.

Knoop, V., Staskawicz, B., and Bonas, U. (1991). Expression of the Avirulence Gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Is Not under the Control of *hrp* Genes and Is Independent of Plant Factors. *J. Bacteriol.* Nov. 7142-7150.

- Kunoh, H., Matsuoka, K., and Kobayashi, I. (1996). Ultrastructure of papillae induced in barley coleoptile cells by a pathogen, *Erysiphe graminis*, and a non-pathogen, *E. pisi*. *Fitopatol. Brasil* 21, 418-425.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T. and Felix, G. (2004). The N-terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* 16, 3496-507.
- Lebeda, A., (1998). Biodiversity of the interactions between germplasm of wild *Lactuca* spp. and related genera and lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*), Report on research programme OECD Biological Resource Management for Sustainable Agricultural Systems. (Wellesbourne, U.K.: HRI).
- Lebeda, A., Dolezalova, I., Ferakova, V., and Astley, D. (2004). Geographical distribution of wild *Lactuca* species (Asteraceae Lactuceae), *Bot. Rev.* 70, 328–356.
- Lebeda, A., Doležalová, I., Křístková, E., Dehmer, K. J., Astley, D., Van de Wiel, C. C. M., and Van Treuren, R. (2007). Acquisition and ecological characterization of *Lactuca serriola* L. germplasm collected in the Czech Republic, Germany, the Netherlands and United Kingdom. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54, 555-562.
- Lee, S. W., Han, S. W., Bartley, L. E., and Ronald, P. C. (2006). Unique characteristics of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* AvrXa21 and implications for plant innate immunity *P. Nat. A. Sci.* 103, 18395-18400.
- Lepoivre, P. (2003). *Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystemes et fondements des strategies de lutte* (No. 632.3 L598p): Ed. De Boeck Université (Bruxelles, BE), pp. 168-188
- Liu J., Liu X., Dai L., and Wang G. (2007). Recent progress in elucidating the structure, function, and evolution of disease resistance genes in plants. *J Genet Genomics* 34, 765–776.
- Lu H, Raid R. (2013). A novel screening method for evaluation of lettuce germplasm for bacterial leaf spot resistance. *HortScience* 48, 171–174.
- Marschner H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd ed. (Academic, London), pp 889.
- McLean, F.T., 1921. A study of the structure of the stomata of two species of citrus in relation to citrus canker. *Bull.Torrey Bot.Club* pp.101-106.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S.Y. (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126, 969-980.

- Melotto M., Underwood W. and He S.Y. (2008) Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* *46*, 101-122.
- Melotto, M., Zhang, L., Oblessuc, P.R. and He, S.Y. (2017). Stomatal defense a decade later. *Plant Physiol.* *174*, 561-571.
- Michelmore, R. W., and Meyers B. C. (1998). Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and death process. *Genome Res.* *8*, 1113–1130.
- Mishina, T. E., and Zeier, J. (2007). Bacterial non-host resistance: interactions of *Arabidopsis* with non-adapted *Pseudomonas syringae* strains. *Physiol. Plantarum.* *131*, 448-461.
- Montillet, J. L., Hirt, H., (2013). New checkpoints in stomatal defense. *Trends Plant sci.* *18*, 295-297.
- Mou, B. (2008). Lettuce. *Handbook of Plant Breeding*, Vol. I, Vegetables I, Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae, J. Prohens and F. Nuez. (Springer, New York) pp. 75-116.
- Nicolas, O., Charles, M.T., Jenni, S., Toussaint, V. and Beaulieu, C. (2018). Relationships between *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* population sizes, stomatal density and lettuce resistance to bacterial leaf spot. *Can. J. Plant. Pathol.* *40*, 399-407.
- Nürnbergger, T. and Scheel, D. (2001). Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.* *6*, 372-9.
- O'Brien, R. D., and S. E. Lindow. (1989). Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. *Phytopathology* *79*, 619-627.
- Oh, H. and Collmer, A. (2005). Basal resistance against bacteria in *Nicotiana benthamiana* leaves is accompanied by reduced vascular staining and suppressed by multiple *Pseudomonas syringae* type III secretion system effector proteins. *Plant J.* *44*, 348-59.
- Oliveira, M. D. M., Varanda, C. M. R., and Félix, M. R. F. (2016). Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. *Phytochem. Lett.* *15*, 152-158.
- Parent, S. É., Parent, L. E., Egozcue, J. J., Rozane, D. E., Hernandez, A., Lapointe, L., Mattos Jr, D. (2013). The plant ionome revisited by the nutrient balance concept. *Front. Plant Sci.* *4*, 39.
- Parker, J., E. (2003). Plant recognition of microbial patterns. *Trends Plant Sci.* *8*, 245-7.

- Pautot V., C. Rabaglia et J.-C. Pernollet. (1999): La résistance des plantes aux agents pathogènes. *Phytoma* 521, 10-15.
- Pernezny, K., Nagata, R., Raid, R. N., Collins, J., Carroll, A. (2002). Investigation of seed treatments for management of bacterial leaf spot of lettuce. *Plant Dis.* 86, 151-155.
- Pieretti I, Royer M, Barbe V, Carrere S, Koebnik R, Cociancich S, Couloux A, Darrasse A, Gouzy J, Jacques MA, Lauber E. (2009). The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited *Xanthomonadaceae*. *BMC Genomics* 10, 1471–1475.
- Poschenrieder, C., Tolra, R., Barceló, J. (2006). Can metals defend plants against biotic stress? *Trends in Plant Sci.* 11, 288-295.
- Qian, W., Han, Z. J., Tao, J. and He, C. Z. (2008). Genome-scale mutagenesis and phenotypic characterization of two-component signal transduction systems in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 33913. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 1128–1138.
- Qian, W., Jia, Y., Ren, S. X., He, Y. Q., Feng, J. X., Lu, L. F., and He, C. (2005). Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res.* 15, 757-767.
- R Development Core Team. (2017). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Ramos, L. J., Volin, R. B., (1987). Role of stomatal opening and frequency on infection of *Lycopersicon* spp. by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 77, 1311-1317.
- Reuveni R., Reuveni M. 1998. Foliar-fertilizer therapy – a concept in integrated pest management. *Crop Prot.* 17, 111–118.
- Reyes-Chin-Wo S, Wang Z, Yang X, Kozik A, Arikait S, Song C, Xia L, Froenicke L, Lavelle DO, Truco MJ, Xia R. (2017) Genome assembly with in vitro proximity ligation data and whole-genome triplication in lettuce. *Nat. Commun.* 8, 14953.
- Robinson, P. E., Jones, J. B., and Pernezny, K. 2006. Bacterial leaf spot of lettuce: Relationship of temperature to infection and potential host range of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Plant Dis.* 90, 465-470.
- Römheld, V., and Marschner, H. 1991. Function of micronutrients in plants. J.J. Mortvelt, F.R. Cox, L.M. Shuman, R.M. Welch (Eds.), *Micronutrients in Agriculture*, Soil Science Society of America, Inc., Wisconsin pp. 297-328

- Ronald, P.C. et Staskawicz, B., J. (1988). The avirulence gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes 50-KD protein. Mol. Plant. Microb. In. 5, 191-198.
- Rudolph K. (1993) Infection of the plant by *Xanthomonas*. In *Xanthomonas*. Swings, J.G. and (Civerolo, E.L. London Chapman & Hall) pp. 193-264.
- Ryan, R. P., Vorhölter, F. J., Potnis, N., Jones, J. B., Van Sluys, M. A., Bogdanove, A. J., Dow, J. M. (2011). Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. Nat. Rev. Microbiol. 9, 344-355.
- Ryder, E. J., (1986). Lettuce breeding, In Breeding Vegetable Crops, Bassett, M., Ed., Westport: AVI Publishing Co. pp. 433-474
- Sahin, F., Abbasi, P. A., Lewis Ivey, M. L., Zhang, J., and Miller, S. A. (2003). Diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* from lettuce. Phytopathology 93, 64-70.
- Sahin, F., and Miller, S. A. (1997). Identification of the bacterial leaf spot pathogen of lettuce, *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, in Ohio, and assessment of cultivar resistance and seed treatment. Plant Dis. 81,1443-1446.
- Sarosh, B., Sivaramakrishnan, S. and Shetty, H. (2005). Elicitation of defense related enzymes and resistance by L-methionine in pearl millet against downy mildew diseases caused by *Sclerospora graminicola*. Plant Pathol. Biochem. 43, 808-815.
- Schirmer, T. and Jenal, U. (2009). Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. Nature Rev. Microbiol. 7, 724-735.
- Sharma S., Duveiller E., Basnet R., Karki C.B., Sharma R.C. (2005) Effect of potash fertilization on helminthosporium leaf blight severity in wheat, and associated increases in grain yield and kernel weight. Field Crop Res. 93, 142-150.
- Shine, M. B., Xiao, X., Kachroo, P., and Kachroo, A. (2018). Signaling mechanisms underlying systemic acquired resistance to microbial pathogens. Plant Sci. 279, 81-86
- Singh, R.J., 2006. Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Vegetable Crops, Volume 3. CRC press.
- Singh, U. M., Sareen, P., Sengar, R. S., and Kumar, A. (2013). Plant ionomics: a newer approach to study mineral transport and its regulation. Acta Physiol. Plant. 35, 2641-2653.
- Société de protection des plantes du Québec. (2003). Noms des maladies des plantes au Canada 4<sup>e</sup> éd., 340 p.

- Stanghellini, M. E., Rasmussen, S. L., and Vandemark, G. J. (1993). Relationship of callose deposition to resistance of lettuce to *Plasmopara lactucae-radiciis*. *Phytopathology* 83, 1498-1501.
- Staskawicz, B. J., Dahlbeck, D., and Keen, N. T. (1984). Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L.) Merr. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6024-6028.
- Subbarao, K. V., Davis, R. M., Gilbertson, R. L., and Raid, R. N. (Eds.). (2017). *Compendium of Lettuce Diseases and Pests*. (St. Paul, MN: APS Press). pp, 112-160
- Sun, W., Dunning, F. M., Pfund, C., Weingarten, R. and Bent, A.F. (2006). Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and its impact on elicitation of *Arabidopsis* FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. *Plant Cell*. 18, 764-79.
- Szczesny, R., Jordan, M., Schramm, C., Schulz, S., Cogez, V., Bonas, U., and Büttner, D. (2010). Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *New Phytol.* 187, 983-1002.
- Tewes, L. J., Stolpe, C., Kerim, A., Krämer, U., and Müller, C. (2018). Metal hyperaccumulation in the Brassicaceae species *Arabidopsis halleri* reduces camalexin induction after fungal pathogen attack. *Envir. Exper. Bot.* 153, 120-126.
- Thalineau, E., Fournier, C., Gravot, A., Wendehenne, D., Jeandroz, S., and Truong, H. N. (2018). Nitrogen modulation of *Medicago truncatula* resistance to *Aphanomyces euteiches* depends on plant genotype. *Mol. Plant pathol.* 19, 664-676.
- Thordal-Christensen, H. 2003. Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 351-357.
- Torres, M. A., Jones, J. D. G. and Dangl, J.L. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 141, 373-8.
- Toussaint V. 1999. Bacterial leaf spot, a new disease of lettuce in Québec caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Phytoprotection* 80, 121-125.
- Toussaint, V. (2008). Ma salade est malade, à qui la faute? Le point sur les maladies bactériennes dans la laitue. 13e année Journée Horticoles de St Rémi Centre communautaire de Saint-Rémi, Saint-Rémi, QC, Canada.
- Toussaint, V., Morris, C. E., and Carisse, O. (2001). A new semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce. *Plant Dis.* 85, 131-136.

Truman, W., de Zabala, M. T. and Grant, M. (2006). Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *Plant J.* 46, 14-33.

Underwood W., Melotto M., and He S. Y. (2007). Role of plant stomata in bacterial invasion *Cell. Microbiol.* 9, 1621–1629.

Van Loon, L. C., and Van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant P.* 55, 85-97.

Van Loon, L.C. (1999). Van Loon, L.C., 1999. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: *Pathogenesis-related proteins in plants*. Eds. S.K. Datta, S. Muthukrishnan, CRC Press LLC, Boca Raton, 1-19.

Von Bodman S.B., Bauer W.D. and Coplin D.L. (2003) Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 455-482.

Vorwerk, S., Somerville, S. and Somerville, C. (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci.* 9, 203-9.

Walley, P.G., Hough, G., Moore, J.D., Carder, J., Elliott, M., Mead, A., Jones, J., Teakle, G., Barker, G., Buchanan-Wollaston, V. and Hand, P., (2017). Towards new sources of resistance to the currant-lettuce aphid (*Nasonovia ribisnigri*). *Mol. Breed.* 37, 4.

Wang, Y., Lu, H., Raid, R. N., Nuessly, G. S. and Faroutine, G. (2015). Diverse responses of lettuce cultivars and germplasm lines to infections of three isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *HortScience*, 50, 650-655.

Wellman-Desbiens, E. (1998). Études sur les sources de contamination par les bactéries responsables de la nervation noire du chou et de la nécrose marginale de la laitue. Master Thesis, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec Canada.

White, F. F., Potnis, N., Jones, J. B., and Koebnik, R. (2009). The type III effectors of *Xanthomonas*. *Mol. Plant Pathol.* 10, 749-766.

Williams, L., and Salt, D.E., (2009). The plant ionome coming into focus. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 247.

Yean, H. C., Atong, M., and Chong, K. P. (2009). Lettucenin A and its role against *Xanthomonas campestris*. *J. Agr. Sci.* 1, 87.

Yigit F. (2011). Acibenzolar-S-methyl induces lettuce resistance against *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* Afr. J. Biotechnol. *10*, 9606-9612.

Zeidler D., Zahringer U., Gerber I., Dubery I., Hartung T., Bors W., Hutzler P. and Durner J. (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. Proc. Natl. Acad. Sci. *101*, 15811-15816.

Zeng, W., Melotto, M., He, S. Y. (2010). Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. Curr. Opin. Biotech. *21*, 599-603.

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D. G., Boller, T. and Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium* mediated transformation. Cell, *125*, 749-60.

Złotek, U., Gawlik-Dziki, U., (2015). Selected biochemical properties of polyphenol oxidase in butter lettuce leaves (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*) elicited with dl- $\beta$ -amino-n-butyric acid. Food Chem. *168*, 423-429.

Zohary, D. and Hopf, M., (1993). Domestication of Plants in the Old World: The Origin and Spread of Cultivated Plants in West Asia, Europe and the Nile Valley, 2nd ed., (Oxford Clarendon Press), pp. 120-160.



